

Université de Sherbrooke

**Développement de nouveaux radiosensibilisateurs bromés
pour la thérapie des cellules cancéreuses du sein**

Par

Rosalie Lemay

Département de médecine nucléaire et radiobiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

En vue de l'obtention du grade de

Maître ès sciences (M.Sc.) en radiobiologie

Juin 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-26014-2

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-26014-2

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Se donner du mal pour les petites choses, c'est parvenir aux
grandes avec le temps.

-Samuel Beckett

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONS.	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VI
RÉSUMÉ	
INTRODUCTION	1
1- Cancer du sein	1
1.1- Épidémiologie et récurrence	1
1.2- Facteurs de risque	1
1.3- Traitements	2
1.3.1- Radiothérapie et thérapie mammaire conservatrice	3
2- Réponses cellulaires aux radiations	6
2.1- Effets des radiations chez les cellules normales	6
2.2- Effets des radiations chez les cellules cancéreuses	7
3- Type de morts cellulaires radio-induites	8
3.1- Mort reproductive	8
3.2- Mort mitotique	8
3.3- Apoptose	9
3.4- Nécrose et oncose	12
3.5- Balance entre les morts radio-induites	13
3.6- Résistance à l'apoptose	
et radiosensibilité chez les cellules cancéreuses	14
4- Radiosensibilisateurs	16

4.1- Qualités d'un bon radiosensibilisateur	16
4.2- Classes de radiosensibilisateurs	16
4.2.1- Analogues de pyrimidines	17
4.2.2- Agents pour cellules en hypoxie	18
5- Atomes radiosensibilisants	20
5.1.- Génération des dommages - Mécanisme résonant	20
5.2- Génération des dommages - Mécanisme non résonant	25
5.3- Génération des dommages - Formation radicalaire	26
5.4- Sources de radiation	27
6- Porphyrines	30
6.1- Caractéristiques	30
6.2- Synthèses chimiques	31
6.3- Incorporation cellulaire	31
6.4- Sensibilisation et rétention tumorale	32
6.5- Porphyrines cationiques et mitochondrie	33
7- Hypothèse et plan de travail	34
8- Préambule	36
MATÉRIEL ET MÉTHODES	39
Culture de cellules mammaires	39
Synthèse des radiosensibilisateurs	39
Test de formation de colonies	44
Accumulation cellulaire des radiosensibilisateurs	45
Stabilité structurale sous rayonnement	46
Potentiel membranaire de la mitochondrie	46

Détection d'apoptose par cytométrie à flux	47
Détection d'apoptose par coloration des acides nucléiques au YO-PRO®-1	49
RÉSULTATS	50
Radiosensibilisation par une porphyrine cationique bromée, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$	50
Indépendance de la présence de l'atome de cuivre au centre de la porphyrine cationique bromée dans le processus de radiosensibilisation	56
Rôle de la localisation des bromes sur la porphyrine cationique dans le processus de radiosensibilisation	58
Ratios radiosensibilisateurs des porphyrines bromées cationiques	60
Toxicité cellulaire des porphyrines cationiques sans radiation	62
Radiosensibilisation des cellules MDA-MB-231 par le BrdU	64
Radiosensibilisation des cellules MC7-L1 par le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$	67
Accumulation cellulaire des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines cationiques	69
Stabilité sous rayonnement des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines cationiques	72
L'effet des radiosensibilisateurs bromés n'est pas associé à l'induction de l'apoptose	77
DISCUSSION	87
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
REMERCIEMENTS	111
RÉFÉRENCES	112

LISTE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. Voies apoptotiques et cibles cellulaires.	11
FIGURE 2. Radiorésistance en fonction de l'incapacité des cellules à entrer en apoptose.	15
FIGURE 3. Représentation schématique du modèle atomique.	21
FIGURE 4. Représentation schématique de l'effet photoélectrique.	23
FIGURE 5. Représentation schématique de l'émission de rayons-x caractéristiques.	23
FIGURE 6. Représentation schématique de l'émission d'électron Auger.	24
FIGURE 7. Probabilité d'émission d'un rayon-x vs un électron Auger.	25
FIGURE 8. Représentation schématique du mécanisme non résonant.	26
FIGURE 9. Représentation schématique de la formation radicalaire.	27
FIGURE 10. Représentation schématique du spectre d'énergie des photons émis par les irradiateurs conventionnels à rayons-x.	29
FIGURE 11. Structure chimique de porphyrine.	30
FIGURE 12. Structure chimique du bromure tétrabromorhodamine.	36
FIGURE 13. Structures chimiques et noms des phtalocyanines neutres.	37
FIGURE 14. Structure chimique de l'acide 9,10,12,13,15,16-hexabromooctadécanoïque.	37
FIGURE 15. Structures chimiques et abréviations des porphyrines bromées et de leurs homologues non bromés.	43
FIGURE 16. Effet du radiosensibilisateur $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 en fonction de la dose de radiation.	53
FIGURE 17. Effet de la concentration du radiosensibilisateur $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	55

FIGURE 18. Effet du radiosensibilisateur dérivé de porphyrine possédant 16 bromes sans cuivre central, comparativement au dérivé avec un atome de cuivre central, sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	57
FIGURE 19. Effet de la position des bromes sur la radiosensibilisation de dérivés de porphyrine sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	59
TABLE 1. Ratios radiosensibilisateurs des porphyrines bromées sur les cellules MDA-MB-231.	61
TABLE 2. Toxicité des porphyrines bromées cationiques sur les cellules MDA-MB-231.	63
FIGURE 20. Effet du radiosensibilisateur BrdU sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	66
FIGURE 21. Effet du radiosensibilisateur $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sur la survie des cellules cancéreuses mammaires de souris MC7-L1.	68
FIGURE 22. Accumulation chez les cellules MDA-MB-231 des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines.	71
FIGURE 23. Effet de la radiation sur la structure chimique des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines.	73
FIGURE 24. Effet du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ pré-irradié seul sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	76
FIGURE 25. Variation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231	79
FIGURE 26. Exposition des phosphatidylsérines chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	82
FIGURE 27. Variation d'induction d'apoptose ou de nécrose chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231.	86

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aq	Aqueux
ATCC	American type culture collection
ATM	Ataxia telangiectasia mutée
Bax	Bcl associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-X _L	B-cell lymphoma X long
BCT	Breast Conservative Therapy
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BRCA 1	Breast cancer gene 1
BRCA 2	Breast cancer gene 2
BrdU	5-Bromodéoxyuridine
CAD	Caspase-activated Dnase
Cu(OAc) ₂	Diacétate de cuivre
CuPBr ₈ (PyM) ₄	[2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -methylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II)
CuPBr ₈ (PyPrBr ₂) ₄	[2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -(2,3-dibromopropyl)pyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II)
CuP(PyM) ₄	[5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -methylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II)

CuP(PyPre) ₄	[5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -propénylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II)
CuP(PyPreBr ₂) ₄	[5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -(2,3-dibromopropényl)pyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II)
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
e ⁻	Électron
EDTA	Éthylène diamine tétraacétate
EPR	Enhanced permeability and retention
eV	Électronvolt
FACScan®	Marque déposée de Becton Dickinson pour cytomètre à flux
FAS	Death receptor, fatty acid synthase
FBS	Sérum foetal bovin
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
Gy	Gray (dose absorbée en joule/kg)
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ PBr ₈ (PyPrBr ₂) ₄	2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -(2,3-dibromopropyl)pyridinium-4-yl)porphyrine
H ₂ P(PyPre) ₄	5,10,15,20-tetrakis(<i>N</i> -propénylpyridinium-4-yl)porphyrine
HBSS	Hanks'balanced salt solution
HEPES	Acide <i>N</i> -[2-Hydroxyethyl]piperazine- <i>N</i> -[2-ethansulfonique]
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
IdU	5-Iododéoxyuridine

IRM	Imagerie par résonance magnétique
keV	Kiloélectronvolt
MeV	Mégaélectronvolt
MALDI-TOF	Matrix-assited laser desorption ionization-time-of-flight
MEM	Minimum Eagle Medium
MTT	Microtetrazolium assay
\bullet OH	Radical hydroxyl
P53	Protéine p53, suppresseur de tumeur
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphate buffer saline
P(Py) ₄	5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyne
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RFU	Unité relative de fluorescence
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sec	Secondaire
SOD	Superoxyde dismutase
RRS	Ratio radiosensibilisateur
TEA	Triéthylamine
TEL	Transfert d'énergie linéaire
TFA	Acide trifluoroacétique
TPD	Thérapie photodynamique
Z	Masse atomique

RÉSUMÉ

Les cellules cancéreuses du sein sont souvent réfractaires aux morts radio-induites, diminuant ainsi l'efficacité des traitements de radiothérapie. L'irradiation d'atomes radiosensibilisants, comme le brome, l'iode et le platine, peut augmenter la concentration locale de radicaux libres dans les cellules. Cet effet peut être obtenu en amplifiant la création d'électrons Auger générés par un mécanisme résonant, ou non résonant impliquant des électrons secondaires créés suite à l'ionisation de l'eau par la radiation. Le but de cette étude était d'évaluer et de comparer des dérivés de porphyrines cationiques bromées comme nouveaux radiosensibilisateurs potentiels pour le traitement du cancer du sein.

La capacité radiosensibilisante de trois porphyrines bromées a été mesurée et comparée avec celle de leur homologue non bromé par test de formation de colonies sur les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231. Seulement les deux porphyrines portant des atomes de brome en périphérie ont démontré un pouvoir radiosensibilisant, soit le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$. Le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ est un dérivé de porphyrine avec 16 brome répartis équitablement sur les chaînes propyles périphériques et sur le centre de la molécule. Ce composé à une concentration de 10 μM , en combinaison avec une dose de radiation de 2 Gy, a conduit à une radiosensibilisation de 76,6 % avec des rayons-x de 14,8 keV, de 53,8 % avec des rayons-x de 70,1 keV et de 48,4 % avec des rayons gamma (^{60}Co). Son effet radiosensibilisateur a été dépendant de la dose de radiation pour les 3 sources entre 1 et 3,5 Gy et de la concentration entre 5 et 10 μM au ^{60}Co .

L'effet radiosensibilisateur du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ mesuré suite à l'irradiation de 2 Gy au ^{60}Co a été indépendant de la présence du métal au centre de la porphyrine bromée et semblable à celui du $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, un dérivé portant 8 bromes uniquement sur ses groupements périphériques. Alors qu'aucun effet radiosensibilisateur n'a été observé avec la troisième porphyrine, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ dont les huit bromes ont été ajoutés uniquement sur le centre de la molécule. D'autre part l'ajout du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sur les cellules cancéreuses mammaires de souris MC7-L1, combiné avec 2 Gy de rayons-x de 14,8 keV, a amené une radiosensibilisation de 41,4 %.

Dans le cas des cellules MDA-MB-231, la radiosensibilisation des porphyrines bromées en périphérie a corrélé avec une accumulation cellulaire de drogue supérieure à leur homologue non bromé de 2,5 fois pour le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, la porphyrine portant 16 bromes et de 4 fois pour le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, la porphyrine avec 8 bromes uniquement en périphérie. Cette augmentation de la radiosensibilité n'a cependant pas été associée à une formation d'espèces toxiques issues de la dégradation des porphyrines lors de l'irradiation, démontré par analyse des porphyrines irradiées en solution et traitement des cellules avec les radiosensibilisateurs pré-irradiés seuls.

La radiosensibilisation par ces composés bromés n'a pas non plus conduit à une externalisation des phosphatidylsérines, ni à une perméabilisation de la membrane cellulaire et aucune variation du potentiel de la membrane mitochondriale n'a été mesurée. Ces observations ont permis de conclure que la mort cellulaire principalement associée à la radiosensibilisation n'était pas l'apoptose.

En conclusion, l'étude de ces porphyrines bromées en périphérie a démontré que cette classe de radiosensibilisateurs pourrait avoir un bon potentiel d'application pour traiter les cellules cancéreuses mammaires.

Mots clés : Cancer du sein, radiothérapie, radiosensibilisateur, brome, porphyrines,

INTRODUCTION

1- Cancer du sein

1.1- Épidémiologie et récurrence

Au Canada, le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez la femme. Au cours de sa vie, une canadienne sur neuf développera ce cancer et une sur vingt-sept risque d'en mourir dans les cinq années suivant le diagnostic. En 2005, la Société canadienne du cancer estimait qu'il y aurait 21600 nouveaux cas de cancers du sein recensés et environ 5300 décès liés à celui-ci. Durant les cinq premières années suivant le traitement, la survie moyenne est de 82 %. À plus long terme, ce pourcentage tend à chuter en fonction des années (www.cancer.ca). Bien que depuis une dizaine d'années le taux d'incidence se soit stabilisé et que le taux de mortalité est en baisse, l'incidence de récurrence demeure considérable. Une réapparition sous forme de nodules locorégionaux ou de métastases du cancer initialement classé comme étant précoce est observée dans 18 à 30 % des cas après 10 ans. Un pourcentage qui reste très élevé (NAKAMURA et al., 2002)(ABRAM RECHT, 1996). Donc, même si les traitements du cancer du sein sont efficaces, il est essentiel de les améliorer pour diminuer cette récurrence.

1.2- Facteurs de risque

Les principales causes des cancers du sein ne sont pas encore très bien définies. Ce type de cancer survient surtout de façon sporadique, seulement une très faible proportion des cas peut être expliquée par des facteurs de risque bien identifiés. En fait, ces fac-

teurs de risque sont communément divisés en trois classes, soit l'influence de l'environnement, le statut hormonal et la prédisposition génétique (KUMAR et al., 1997).

Plus particulièrement, les risques de développer un cancer du sein augmentent avec l'âge, varient selon la localisation géographique, le statut socioéconomique et les habitudes de vie, comme l'alimentation. Une longue exposition aux hormones est également plus néfaste, que ce soit par une puberté précoce, une ménopause plus tardive ou une prise prolongée d'hormones exogènes. La présence d'hormones estrogéniques contribue à la croissance cellulaire qui est plus marquée chez les cellules cancéreuses, pouvant ainsi mener à une prolifération cellulaire trop importante et au développement de cancers.

Les risques de cancer du sein sont également corrélés avec la densité mammaire et l'historique familial. En fait, 5 à 10 % des cas de cancers du sein ont une incidence héréditaire et la majorité impliquent des mutations dans des gènes importants. Notamment, BRCA 1 et BRCA 2 qui sont imputés à 80 - 90 % des cas de cancers du sein héréditaires, p53 (suppresseur de tumeurs) qui est lié à 50 % des cas de cancers et à 30 % de ceux du sein, et avec un pourcentage plus faible les gènes ATM et PTEN (DUMITRESCU & COTARLA, 2005)(XIA & POWELL, 2002). L'inhibition de ATM, un inhibiteur de la topoisomerase, sensibilise les carcinomes mammaires à la radiation ionisante (COWELL et al., 2005).

1.3- Traitements

Divers traitements peuvent être donnés aux patientes atteintes de cancer du sein. Le type de traitement choisi dépend du type de cancer, du stade de la maladie et de la per-

sonne à traiter. Le traitement peut être systémique, comme c'est le cas de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie qui circulent dans tout l'organisme ou le traitement peut être local, comme c'est le cas de la chirurgie et de la radiothérapie qui se concentrent sur la région cancéreuse (www.cancer.ca).

1.3.1- Radiothérapie et thérapie mammaire conservatrice

Les tumeurs primaires de cancer du sein, surtout en stade précoce, sont plus couramment traitées par thérapie mammaire conservatrice (BCT, Breast Conservative Therapy). La BCT, contrairement à la mastectomie (ablation complète du sein), consiste en un traitement de radiothérapie néo-adjuvante afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles suite à une chirurgie mammaire conservatrice (HIRAOKA et al., 1997). L'utilisation de la radiation ionisante vise surtout à endommager, par effet direct et indirect, l'ADN des cellules cancéreuses. Les sources de radiation utilisées sont soit des rayons-x (production d'énergie au niveau des électrons) ou gamma (production d'énergie au niveau nucléaire).

Les effets secondaires systémiques de la radiation sur les patients traités sont peu sévères, mais lors du traitement les tissus sains sont aussi irradiés. L'irradiation du cancer du sein suite à une mastectomie ou tumorectomie s'effectue préférentiellement en fractionnement de doses ou même d'hypofractionnement de la dose, selon le traitement utilisé. Le fractionnement de la dose de radiation est effectué afin que les tissus sains aient le temps de se réparer. Les cellules saines pouvant réparer plus efficacement les dommages à l'ADN que les cellules cancéreuses, un fractionnement de la dose entraîne une bonne

survie chez les tissus normaux tout en induisant une mortalité importante chez les cellules cancéreuses. En plus, ce fractionnement permet à la tumeur de se réoxygéner, contribuant à augmenter la sensibilité aux fractions subséquentes de radiation, permet également la repopulation de la population des cellules viables durant le traitement et la redistribution des cellules dans des phases du cycle cellulaire de différentes radiosensibilités (HALL, 2000)(WITHERS, 1975).

Le traitement de radiothérapie s'échelonne sur un total de 5 à 7 semaines pour une dose globale de 50 à 60 Gy donnée par dose quotidienne de 2 Gy (HORTON et al., 2005)(WHELAN et al., 2002). De façon plus conventionnelle, les fractions d'irradiation sont fixées à 2 Gy pour un traitement global de 40 Gy en 25 fractions à raison de 5 fractions par semaine. Des traitements accélérés sont également donnés avec des doses plus élevées, par exemple 3 irradiations de 3,3 Gy par semaine, une dose totale de 44, 42,5 ou 40 Gy en 16 fractions respectivement de 2,77, 2,65 ou 2,5 Gy, ou encore des fractions de 3,12 Gy ou un traitement plus intense en 23 fractions de 2,61 Gy (COSSET, 2005)(VASS & BAIRATI, 2005).

Les méta analyses sur les différents traitements de radiation pour le cancer du sein sont effectuées afin de déterminer quel traitement permet d'optimiser la survie des patients, de diminuer les effets dommageables, de diminuer la récurrence du cancer, d'accommoder les patients, de diminuer les effets cosmétiques non désirables, d'éviter les complications cardiaques et pulmonaires. Donc, elles servent à déterminer le meilleur index thérapeutique, i.e le meilleur ratio entre la dose efficace et la dose toxique

(WHELAN et al., 2002)(HORTON et al., 2005)(COSSET, 2005)(VASS & BAIRATI, 2005). La BCT semble donc être le traitement de choix pour obtenir le meilleur index thérapeutique. Elle diminue les complications à long terme de 57-90 %.

Par exemple, chez les femmes âgées avec un cancer du sein précoce la radiation est associée à un risque plus faible de complications, avec un ratio de risque de 0,19 et réduction absolue de risque de 4 évènements par 100 femmes à 5 ans (SMITH et al., 2006). La BCT engendre une survie spécifique à la radiation de 97 % (NAKAMURA et al., 2002). Avec une dose biologique équivalente de 40 à 60 Gy, en fractions de 2 Gy, la radiation adjuvante a été statistiquement et significativement associée à une amélioration de la survie à 10 ans avec une augmentation absolue de la survie de 6,4 et un ratio de mort de 0,87 (GEBSKI et al., 2006).

2- Réponses cellulaires aux radiations

2.1- Effets des radiations chez les cellules normales

Dans le cas des cellules normales, c'est-à-dire chez les cellules où toutes les protéines impliquées sont fonctionnelles, plusieurs réactions peuvent survenir suite à une irradiation. Ces divers processus dépendent de l'état de la cellule irradiée, du type et de la gravité des dommages générés. Les principales protéines responsables des réponses aux radiations sont impliquées dans le cycle cellulaire, la transduction de signaux, la détection et la réparations des dommages à l'ADN, par exemple p53, ATM, pRB, PARP, DNA-PK, p21^{WAF1}, p57^{KIP2}, MAPK et certaines cyclines, phosphatases et kinases (SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000)(FAVAUDON, 2000).

L'irradiation peut induire une redistribution des cellules dans le cycle cellulaire ou encore un arrêt temporaire ou permanent du cycle. Les cellules peuvent procéder à la détection et à la réparation des lésions radio-induites lors du point de contrôle de l'intégrité du génome avant le passage en mitose de la phase G2, et ainsi survivent. Le processus de mort cellulaire peut quant à lui être initié par exemple via p53 en G1, période d'inactivité apparente entre les événements majeurs du cycle où il y a accumulation de réserves. Les différences majeures entre les cellules normales et cancéreuses sont surtout au niveau de G1, soit qu'elles affectent la régularisation de ce compartiment, soit qu'elles altèrent la réponse aux agents mitogènes (FAVAUDON, 2000)(SCHMIDT-ULLRICH et al., 2000)(ROSS, 1999).

2.2- Effets des radiations chez les cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses répondent différemment aux radiations que les cellules normales. L'apparition du caractère malin et l'altération de la réponse cellulaire aux radiations peuvent être associées à une délétion d'un gène suppresseur de tumeur, à une dérégulation des enzymes ou des facteurs de transcription impliqués soit dans le cycle cellulaire, la réparation cellulaire ou l'aptitude à l'apoptose (FAVAUDON, 2000). Les cellules cancéreuses peuvent perdre leur capacité à effectuer correctement les points d'arrêt de contrôle du cycle cellulaire. Ces cellules, fréquemment très réfractaires aux morts radio-induites, arborent également une apoptose souvent altérée (XIA & POWELL, 2002). Donc, lorsque les cellules cancéreuses du sein sont soumises aux radiations, comme lors des traitements de radiothérapie, les cellules tumorales peuvent présenter une radiorésistance ou une reprise de croissance.

Les cellules qui répondent mal aux traitements de radiation peuvent avoir un défaut dans les acteurs ayant un rôle critique dans la réponse cellulaire aux bris double dans l'ADN. p53 et ATM sont les principaux détecteurs des dommages induits par la radiation, ils régulent les points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN. BCRA1 et DNA-PK ont également un rôle à ce niveau (COWELL et al., 2005). ATM est rapidement activé suite à l'irradiation pour ensuite aller phosphoryler des protéines impliquées dans ces processus (FERRI & KROEMER, 2001). Les cellules possédant un gène ATM déficient sont radiosensibles, comme chez les patients souffrant d'ATM qui sont très sensibles à la radiation et ont des risques plus élevés de développer des cancers. Des cellules de carcinomes mammaires ont même été sensibilisées aux radiations ionisantes par inhibition de ATM (COWELL et al., 2005).

3- Type de morts cellulaires radio-induites

Une variété de morts peut être induite par la radiation, grandement dépendante de la dose de radiation, du type de cellules et des dommages engendrés chez celles-ci. Parmi ces morts, notons principalement la mort reproductive, la mort mitotique, l'apoptose, la nécrose et l'oncose (FAVAUDON, 2000). Certains auteurs mentionnent et caractérisent d'autres types de morts cellulaires, mais celles-ci ne sont pas unanimement acceptées et utilisées.

3.1- Mort reproductive

La cellule en mort reproductive (sénescence) conserve son activité métabolique, mais perd sa capacité clonogéniques, sa capacité à former une colonie. La cellule est d'apparence intacte, effectue de la synthèse protéique, mais est en arrêt continu en G1 et ne se divise plus (RONINSON et al., 2001). Cette mort était initialement perçue comme étant permanente. Cependant, dans certains cas une reprise de la croissance après un arrêt de prolifération *in vitro* pendant 30 à 45 jours post-irradiation a été observée, indiquant une mort reproductive temporaire après un arrêt prolongé (SCHMIDT-ULLRICH et al., 1992).

3.2- Mort mitotique

La radiation peut aussi causer la mort mitotique. Suite à des dommages à l'ADN, une accumulation d'aberrations chromosomiques entraîne la mort cellulaire pendant l'initiation de la division cellulaire. Ce phénomène peut survenir lors de la première division ou durant l'une des 5 divisions subséquentes. Ces cellules en sursis peuvent égale-

ment propager des lésions non réparées à leurs descendances engendrant une instabilité génomique. La mort mitotique est donc associée à une mauvaise mitose post-irradiation donnant naissance à des cellules micronuclées avec des chromosomes non-condensés ayant subi des réarrangements chromosomiques (RONINSON et al., 2001).

3.3- Apoptose

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique normal qui se produit durant l'embryogenèse et est essentiel pour éliminer les cellules endommagées ou non désirables. Les changements physiologiques et morphologiques caractéristiques de l'apoptose sont le rétrécissement de la cellule, une hypercondensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN génomique en nucléosomes, la formation de corps apoptotiques et finalement une phagocytose par les cellules environnantes conséquence de l'externalisation de phospholipides membranaires, les phosphatidylsérines. Le contenu cellulaire n'étant pas en exposition avec l'environnement, aucune réaction inflammatoire n'est induite (PRISE et al., 2005)(SHI, 2001).

Selon les lignées cellulaires et les stimuli, les cellules possèdent plusieurs éléments déclencheurs de ce type de mort ou plusieurs mécanismes différents pour l'engendrer. Ainsi, l'apoptose survient en réponse à un large éventail de facteurs de stress comme les radicaux libres, une privation de facteurs de croissance et d'hormones ou la présence d'agents cytotoxiques. L'apoptose est un processus complexe, nécessitant un apport en énergie, avec des voies et des étapes multiples, régulé par différentes protéines (SHI, 2001)(KUMAR et al., 1997).

Au point de vue moléculaire, l'apoptose se divise en trois phases, soit l'initiation, l'exécution et la dégradation. L'initiation est une phase très hétérogène durant laquelle les voies biochimiques participant dans le processus sont dépendantes de l'agent inducteur. L'exécution est la phase commune où la cellule décide de mourir et entreprend le processus. L'activation d'hydrolases cataboliques, caspases et nucléases, compose la phase de dégradation nécessaire à l'acquisition des caractéristiques morphologiques d'une apoptose complète (COSTANTINI et al., 2000). Les caspases sont les exécuteurs principaux de cette mort. Ces enzymes, des cystéines protéases, clivent leurs nombreux substrats après un résidu aspartate. Les caspases sont divisées en deux groupes, selon leur spécificité de substrat et la longueur de leur prodomaine. Les caspases effectrices, la caspase-3, 6 et 7, clivent les cibles cellulaires responsables de la mort cellulaire. Ces caspases sont préalablement activées par les caspases initiatrices, la caspase-2, 8, 9 et 10 (YANG et al., 2003)(COSTANTINI et al., 2000). L'apoptose est principalement divisée en deux voies (figure 1). La voie extrinsèque est initiée au niveau des récepteurs de mort cellulaire à la membrane plasmique activant une série de protéases et de DNases. Alors que la voie intrinsèque est initiée par une perturbation de la mitochondrie et de l'homéostasie intracellulaire. Dans la voie intrinsèque, le cytochrome C est tout d'abord libéré de l'espace intermembranaire mitochondrial suivi de la co-activation de la caspase-9 qui active subseqüemment la caspase-3. Cette dernière caspase active alors le CAD (caspase activated DNase), conduisant finalement à la dégradation de substrats essentiels et à la mort de la cellule (PRISE et al., 2005)(SHI, 2001). Plusieurs régulateurs interfèrent dans la voie mitochondriale. Les membres de la famille de Bcl-2 peuvent avoir un caractère pro ou anti-apoptotique. Les protéines Bcl-2 et Bcl-X_L inhibent l'apoptose, alors que Bid et Bax conduisent à la mort cellulaire (FERRI & KROEMER, 2001).

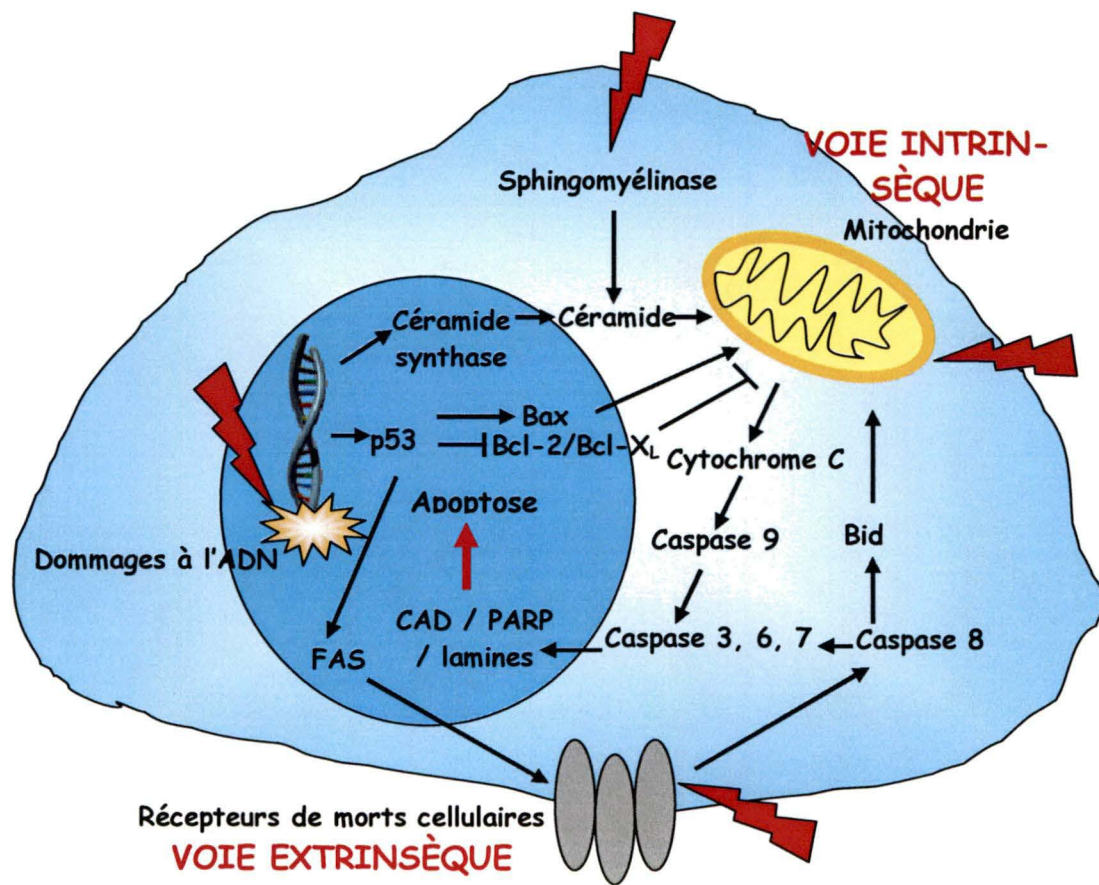


Figure 1. Voies apoptotiques et cibles cellulaires (Adaptée de PRISE et al., 2005).

L'apoptose peut également être induite par action directe sur la membrane cellulaire activant l'hydrolyse par la sphingomyélinase de la shingomyéline en céramide, un second messenger stimulant la voie intrinsèque. Les dommages à l'ADN peuvent aussi déclencher l'apoptose par action de p53 sur certains facteurs pro-apoptotique de la famille de Bcl-2, comme Bax qui active soit les ligands de mort cellulaire, les récepteurs de mort cellulaire ou la céramide synthase (figure 1) (PRISE et al., 2005)(ROSS, 1999). Le noyau, le réticulum endoplasmique, le Golgi et les lysosomes ont aussi leur propre détecteur de stress non physiologique sensible à l'induction de l'apoptose. Leur altération biochimique mène à une activation de caspases ou une perturbation de la membrane mitochondriale (FERRI & KROEMER, 2001).

3.4- Nécrose et oncose

La nécrose est un processus causant la perte de l'intégrité de la membrane, conduisant à un gonflement de la cellule, une dilatation des organelles et du cytoplasme, une vacuolisation et la dégradation aléatoire de l'ADN. Le contenu cellulaire est finalement déversé dans l'environnement, causant une réaction inflammatoire suite à la lyse cellulaire (JONATHAN et al., 1999)(KUMAR et al., 1997). Le terme oncose est également utilisé, mettant en évidence que l'apoptose n'est pas opposée à la nécrose de façon systématique. L'oncose présente un gonflement de la cellule, un dysfonctionnement des pompes ioniques membranaires et une lyse cellulaire normalement attribuée à la nécrose, mais elle est plus rapide et présente également une lyse de la chromatine et l'implication potentielle de certains facteurs de l'apoptose, comme les caspases (ABEND, 2003)(FAVAUDON, 2000).

3.5- Balance entre les morts radio-induites

Les doses de radiation données en clinique lors des traitements de radiothérapie sont assez faibles; la mort mitotique, la mort reproductive et l'apoptose y sont donc fréquemment observées. La lyse cellulaire survient surtout lorsque de fortes doses de radiation sont utilisées (HALL, 2000) ; par conséquent, l'oncose et la nécrose ne sont habituellement pas induites aux doses cliniques. Chez les carcinomes mammaires (acini et canaux galactophores), les morts mitotique et reproductive sont les deux types de mort les plus généralement observés (RONINSON et al., 2001)(ROSS, 1999), puisque l'apoptose est généralement réprimée chez ces tumeurs (FAVAUDON, 2000).

La mort mitotique et la mort cellulaire immédiate (autre mort radio-induite à forte dose dont le mécanisme n'est pas très bien connu) sont souvent confondues avec l'apoptose. Elles ne possèdent pas de caractéristiques finales propres. C'est-à-dire que selon la cellule endommagée, les étapes finales de ces morts peuvent emprunter des voies variées (apoptose, nécrose, oncose, mort reproductive). L'apoptose radio-induite est généralement stimulée de façon plus rapide que la mort mitotique et reproductive. Elle peut se déclencher à toutes les étapes du cycle cellulaire, alors que la mort mitotique se produit seulement lorsque la cellule tente de rentrer en mitose. Lors de la mort mitotique, les aberrations chromosomiques ne sont pas détectées tout de suite après leur formation, alors que lorsque la radiation a créé des bris d'ADN considérables, la cellule va entrer en apoptose. L'arrêt permanent en G1 de la mort reproductive semble également être induit de façon indépendante de p53, ce qui n'est pas le cas de plusieurs voies apoptotiques (FAVAUDON, 2000)(COHEN-JONATHAN et al., 1999).

3.6- Résistance à l'apoptose et radiosensibilité chez les cellules cancéreuses

Un dysfonctionnement des voies apoptotiques confère une résistance à l'induction de l'apoptose et résulte en une baisse de la sensibilité des cellules cancéreuses humaines aux agents thérapeutiques, comme la radiation ionisante. L'initiation et la progression du cancer sont aussi stimulées par la résistance à l'apoptose (YANG et al., 2003). La radiosensibilité des cellules cancéreuses varie beaucoup d'un type cellulaire à l'autre, les cellules détenant le plus haut niveau de résistance à la radiation possèdent souvent un haut niveau de résistance à l'apoptose (figure 2). Les cellules chez lesquelles l'apoptose est absente doivent recevoir une dose de radiation plus grande pour arriver à un même taux de mortalité que chez les cellules où l'apoptose est dominante.

Certaines protéines clés mutées impliquées dans la prédisposition génétique du cancer du sein, mentionnées précédemment, jouent aussi un rôle dans la mauvaise réponse aux traitements de radiothérapie et dans l'induction déficiente de l'apoptose. Une surexpression de Bcl-2, un facteur anti-apoptotique, a été associée à une augmentation de la résistance cellulaire à l'induction d'apoptose par les radiations ionisantes (JONATHAN et al., 1999). Le facteur bcl-2 est muté dans 70 % des cas de cancers du sein. p53 est muté dans 30 % des cas de cancer du sein et une diminution de p53 fonctionnelle entraîne une perte de la capacité à l'apoptose. Les gènes BRCA 1 et BRCA 2 défectueux, tout comme ATM, semblent engendrer une sensibilité aux radiations. La défectuosité de ces gènes entraîne également une réparation inadéquate des lésions radio-induites, qui seraient normalement éliminée par une induction suffisante d'apoptose (DUMITRESCU & COTARLA, 2005)(XIA & POWELL, 2002).

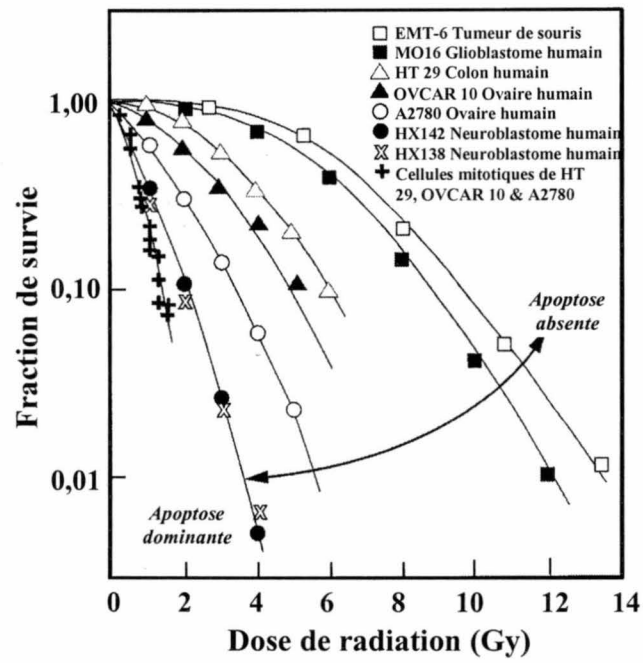


Figure 2. Radiorésistance en fonction de l'incapacité des cellules à entrer en apoptose (Adaptée de HALL, 2000).

4- Radiosensibilisateurs

Un des buts à atteindre depuis longtemps pour améliorer les traitements de radiothérapie consiste à développer de bons radiosensibilisateurs. L'utilisation de radiosensibilisateurs permet de préserver les tissus sains qui sont présents dans le champ d'irradiation. Le traitement en présence de radiosensibilisateur peut permettre, en comparaison au même traitement sans radiosensibilisateur, l'induction du même niveau de mortalité chez les cellules cancéreuses, mais avec une dose de radiation réduite ou faire augmenter la quantité de dommages formés avec la même dose de radiation.

4.1- Qualités d'un bon radiosensibilisateur

Un bon radiosensibilisateur est bien entendu un composé ayant la capacité d'augmenter l'effet toxique des radiations ionisantes et est idéalement non toxique en absence de radiation. Une bonne molécule radiosensibilisante doit présenter un effet différentiel important pour éventuellement être utilisée en clinique et apporter un gain dans le traitement. Le radiosensibilisateur idéal doit donc être retenu de façon préférentielle dans les tissus cibles, viser spécifiquement les tissus cancéreux et épargner les tissus sains. Le composé devrait être chimiquement pur et stable, de composition connue et être rapidement excrété du corps pour minimiser la toxicité systémique (HALL, 2000)(ALI & VAN LIER, 1999).

4.2- Classes de radiosensibilisateurs

Plusieurs radiosensibilisateurs ont été étudiés jusqu'à aujourd'hui. La plupart radiosensibilise en augmentant les dommages à l'ADN. Les analogues de pyrimidines et les

agents pour cellules en hypoxie forment les deux classes de radiosensibilisateurs qui ont été majoritairement analysées. Malgré des résultats prometteurs en laboratoire, ces radiosensibilisateurs ont démontré une absence de gain significatif en clinique (HALL, 2000).

4.2.1- Analogues de pyrimidines

Une classe de radiosensibilisateurs importante est constituée des analogues de pyrimidines. Ces composés halogénés, comme le BrdU et l'IdU, radiosensibilisent en s'incorporant dans l'ADN. La concentration de drogue présente doit cependant être élevée pour conduire à une augmentation de la mort radio-induite. Normalement, l'incorporation de ces drogues (BrdU et IdU) dans une tumeur est associée à sa croissance rapide. Par exemple, le BrdU a diminué la survie cellulaire après l'irradiation de cellules humaines de carcinome de poumon et colorectale (FRANKEN et al., 2000). L'incorporation et l'irradiation du BrdU a sensibilisé des cellules à l'apoptose radio-induite en inhibant la réparation des dommages potentiellement létaux (GUO et al., 1997). De plus, avec l'application d'une dose biologique équivalente, l'utilisation du BrdU a mené à une efficacité relative biologique de 1,01 à 1,12 (PIGNOL et al., 2003).

Néanmoins, le niveau de radiosensibilisateur qui doit être incorporé dans la cellule pour que celui-ci soit efficace amène souvent une grande toxicité. Le ratio thérapeutique du traitement avec celui-ci reste encore à être amélioré. Cependant, même si le mécanisme d'action du BrdU est de mieux en mieux compris, l'incorporation de BrdU n'a pas mené à une amélioration substantielle de radiosensibilité contre les tumeurs malignes en clinique, mais plutôt à une toxicité myélosuppressive et dermatologique (GROVES et al., 1999).

4.2.2- Agents pour cellules en hypoxie

Les agents pour cellules en hypoxie forment le deuxième type de radiosensibilisateurs les plus étudiés, comme le métronidazole et le misonidazole. Les cellules normales bien oxygénées présentent une plus grande radiosensibilité, contrairement à certaines cellules tumorales présentant des zones hypoxiques radiorésistantes. Les agents sensibilisateurs augmentent la radiosensibilité des cellules déficientes en molécules d'oxygène, mais n'affectent pas celle des cellules normales bien aérées. Ces composés peuvent substituer l'oxygène à cause de leur affinité électronique, ils peuvent également diffuser dans les régions pauvrement vascularisées et ne sont pas rapidement métabolisés par les cellules de la tumeur à travers lesquelles ils diffusent (HALL, 2000)(ALI & VAN LIER, 1999).

Le problème de l'hypoxie est plus important pour les carcinomes squameux que pour les adénocarcinomes. Ce type d'agent imitant l'effet radiosensibilisateur de l'oxygène n'a pas mené à un gain significatif en clinique. Son niveau d'efficacité est controversé, mais il semble légèrement avantageux pour les cancers de la tête et du cou (HALL, 2000). Un agent étudié pour traiter les cellules hypoxiques, la chlorpromazine, a démontré un effet plus bénéfique, en combinaison avec la radiation conventionnelle, sur la survie des patients atteints de cancers de la tête et du cou (HUILGOL et al., 1998).

Le doranidazole, un analogue du nucléoside 2-nitroimidazole, a aussi été utilisé sur des cellules cancéreuses pancréatiques. Cette drogue a donné des ratios radiosensibilisateurs plus élevés que 1 sur les cellules hypoxiques, mais l'effet a été nul sous conditions aérobiques (SHIBAMOTO et al., 2000).

Les radiosensibilisateurs exploités jusqu'à aujourd'hui n'ont pas toujours été efficaces en clinique ou ne peuvent qu'être utilisés sur des types très spécifiques de tumeurs. Il devient donc nécessaire de développer de nouveaux radiosensibilisateurs avec de nouvelles modalités d'action.

5- Atomes radiosensibilisants

Le développement d'une classe de radiosensibilisateurs utilisant des atomes radiosensibilisants de masse atomique (Z) élevée tel que l'iode, le platine et le brome représente une des façons de répondre au besoin en radiosensibilisateur. Le BrdU, l'IdU et le *cis*-platine sont des exemples de ce type de radiosensibilisateurs. En passant par plusieurs mécanismes, ces atomes peuvent augmenter le stress oxydatif cellulaire en amplifiant la création de radicaux libres, d'électrons secondaires et d'électrons Auger. La contribution relative de chacun des processus pour augmenter la formation de dommages près de l'atome radiosensibilisant dépend de l'énergie du rayonnement et de la nature de l'atome irradié (PIGNOL et al., 2003).

5.1.- Génération des dommages - Mécanisme résonant

Dans le mécanisme résonant, la radiosensibilisation se fait par la génération de photoélectrons et d'électrons Auger. Le déplacement d'un électron d'une couche électronique à l'autre implique un transfert d'énergie. Si l'électron quitte l'atome ou s'il se déplace vers une couche plus externe, une absorption d'énergie est nécessaire. Tandis que le déplacement de l'électron vers l'intérieur de l'atome aura comme conséquence l'émission d'énergie. L'énergie de liaison représente l'énergie exigée pour enlever un électron de sa couche. Cette énergie s'élève si l'électron est situé dans une couche près du noyau, c'est-à-dire que l'énergie de liaison $K > L > M$ et ainsi de suite jusqu'à la dernière couche électronique possédant une énergie très faible (figure 3). L'énergie de transfert augmente également avec la masse de l'atome (CHERRY et al., 2003).

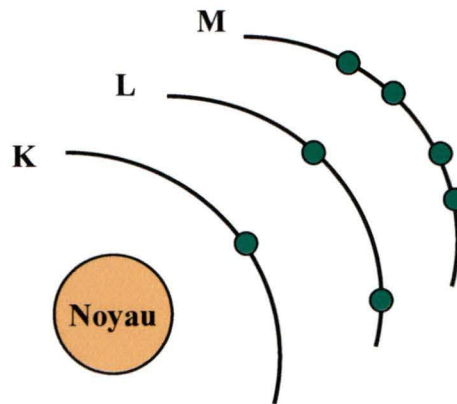


Figure 3. Représentation schématique du modèle atomique (Adaptée de CHERRY et al., 2003).

Pour qu'il y ait résonance, l'énergie du photon incident doit correspondre à celle requise pour éjecter un électron d'une des orbitales électroniques (figure 4). Un rayon-x transfère alors son énergie à un électron de la couche K (ou une autre couche électronique) de l'atome radiosensibilisant. Après transfert de l'énergie, le photoélectron est éjecté, laissant une vacance et le photon disparaît. Ce phénomène est appelé effet photoélectrique.

La probabilité d'engendrer un effet photoélectrique dépend de l'énergie du photon incident et du Z de la matière irradiée. La majorité des tissus corporels ont un $Z \geq 20$. À ces valeurs, pour des énergies se situant entre 10 et 100 keV, l'effet photoélectrique est induit suivant la même probabilité que l'effet Compton. Celui-ci devient prépondérant aux énergies plus élevées. (CHERRY et al., 2003) La prédominance de l'un ou l'autre de ces effets sera abordée un peu plus en détails à la section 5,4. L'énergie de la résonance dépend aussi de la nature de l'atome. Elle est de 13,4 keV pour la couche K du brome

(LARSON et al., 1989), de 78,4 keV pour la couche K du platine (BISTON et al., 2004) et de 33,2 keV pour la couche K de l'iode (KARNAS et al., 1999).

La vacance ainsi créée sur une orbital est comblée par un électron d'une couche supérieure (L ou M). Ce déplacement engendrera une émission d'énergie égale à la différence d'énergie de liaison entre les deux couches et sera émise sous forme de rayons-x caractéristiques (figure 5). Ces rayons sont dits caractéristiques parce qu'ils sont typiques de l'atome irradié.

Une alternative à l'émission de rayons-x caractéristiques est l'émission d'électron Auger. Dans ce cas, il n'y a pas de rayons-x émis. L'énergie émise est plutôt transférée à un autre électron sur un autre orbital qui sera à son tour éjecté et portera le nom d'électron Auger (figure 6). Une deuxième vacance est générée par le départ de l'électron Auger et cette vacance sera à son tour comblée par un électron d'une couche supérieure. Une cascade d'émission de rayons-x caractéristiques ou d'électrons Auger en résulte donc. La probabilité de cascade dépend de l'atome et de la couche où la vacance est créée.

Les électrons Auger créés ont plusieurs avantages. Ils sont de faible énergie, migrent sur une courte distance et possèdent un transfert d'énergie linéaire (TEL) élevé. Ils peuvent donc potentiellement être générés en plus grande quantité dans des localisations particulières de la cellule cancéreuse et augmenter la formation de dommages (KARNAS et al., 2001).

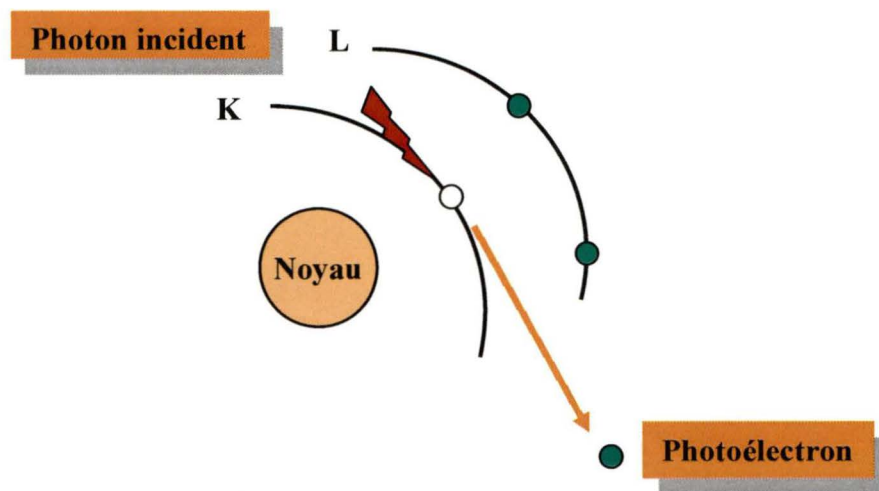


Figure 4. Représentation schématique de l'effet photoélectrique. Éjection d'un photoélectron suite au transfert d'énergie d'un photon incident (Adaptée de CHERRY et al., 2003).

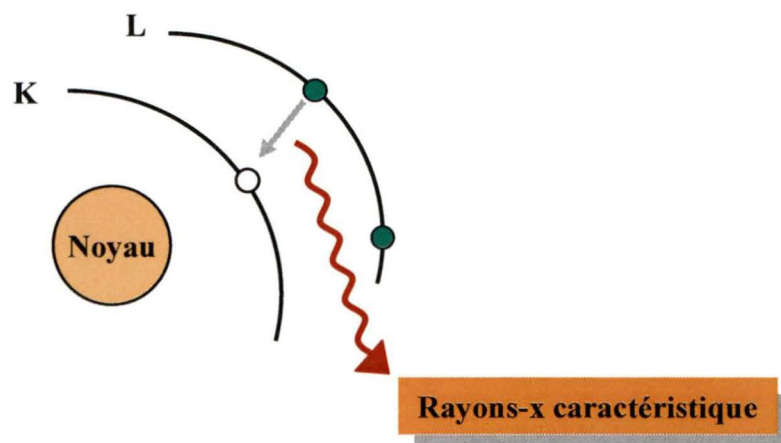


Figure 5. Représentation schématique de l'émission de rayons-x caractéristiques. Émission de rayons-x caractéristiques suite au remplissage de la vacance par un électron supérieur (Adaptée de CHERRY et al., 2003).

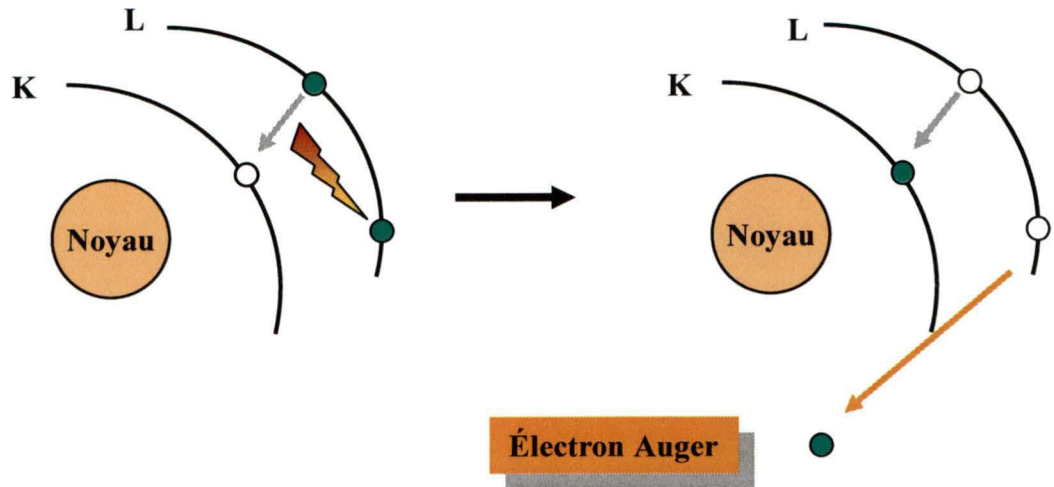


Figure 6. Représentation schématique de l'émission d'électron Auger. Éjection d'un électron Auger suite au remplissage de la vacance par un électron supérieur (Adaptée de CHERRY et al., 2003).

La probabilité d'émettre des rayons-x ou des électrons Auger est dépendante de l'atome irradié (figure 7). En fait, plus un atome possède une masse atomique élevée, plus la tendance se fera vers l'émission de rayons-x au détriment de l'émission d'électrons Auger. Cependant, un plus grand nombre d'électrons Auger pourra être émis par cascade et leur énergie sera aussi plus élevée (CHERRY et al., 2003).

Le brome avec sa masse atomique de 35 et sa probabilité Auger de 40 %, l'iode avec son Z de 53 et sa probabilité Auger de 18 % et le platine avec son Z de 78 et sa probabilité Auger de 8 % sont de bons atomes radiosensibilisants pour générer des électrons Auger. Ils possèdent un Z qui fait le compromis entre probabilité et amplitude de la cascade Auger. Ces atomes ont aussi l'avantage d'avoir une énergie de liaison K plus grande, ce qui permet d'irradier avec des photons plus énergétiques et donc plus pénétrants (KARNAS et al., 1999).

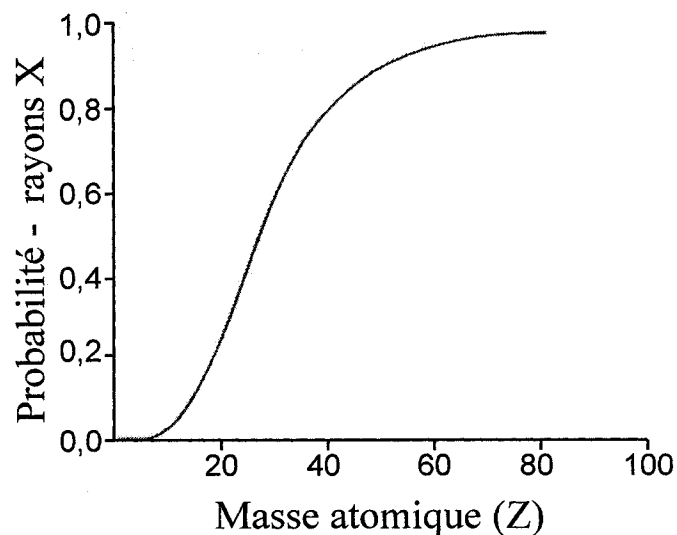


Figure 7. Probabilité d'émission d'un rayon-x comparativement à l'émission d'un électron Auger en fonction de la masse atomique de l'atome (Adaptée de CHERRY et al., 2003).

5.2- Génération des dommages - Mécanisme non résonant

En revanche, la radiosensibilisation peut se faire sans résonance par les électrons secondaires produits après l'ionisation des molécules d'eau par des photons énergétiques, rayons-x, rayons gamma ou d'autres sources de radiation ionisante. Ces électrons interagiraient avec les électrons du brome induisant une cascade Auger suite à l'éjection d'un électron sur une orbitale des couches inférieures (figure 8) (KOBAYASHI et al., 2002).

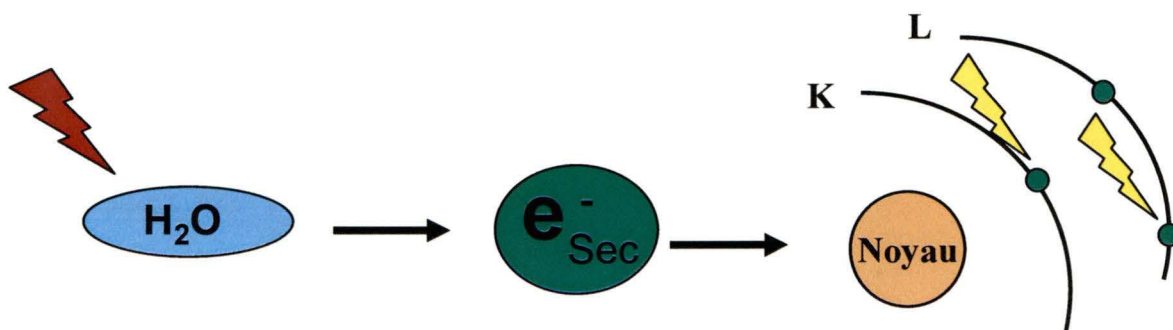


Figure 8. Représentation schématique du mécanisme non résonant. Excitation électronique du brome par les électrons secondaires.

5.3- Génération des dommages - Formation radicalaire

Le brome, ainsi que certains atomes avec un Z assez élevé comme l'iode, peuvent aussi être des halogènes possédant une bonne électroaffinité. Une abstraction des électrons secondaires de faibles énergies ou des électrons aqueux du milieu par le brome, fixé sur la molécule porteuse, peut avoir lieu. Un clivage de la liaison entre le brome et le carbone s'en suit, accompagné de la formation d'un site radicalaire sur la molécule porteuse qui pourrait être responsable de la sensibilisation (figure 9). Ce processus est observé lors de l'irradiation du BrdU où il y a formation du radical uracilyle qui est très réactif et de Br^- (CECCHINI et al., 2004)(WOJCIK et al., 2003).

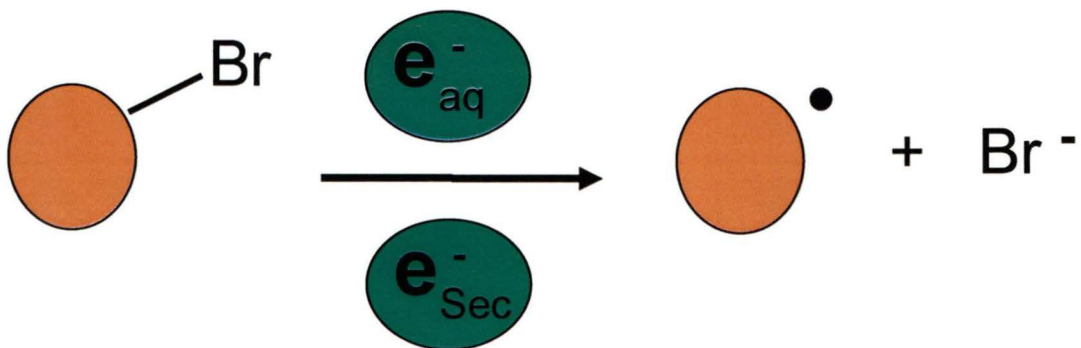


Figure 9. Représentation schématique de la formation radicalaire. Bris de la liaison brome-carbone suite à l'abstraction électronique par le brome.

5.4- Sources de radiation

Le potentiel de radiosensibilisation par l'utilisation d'atome radiosensibilisant est grandement dépendant de l'énergie de la radiation. Le rayonnement gamma favorise les mécanismes non résonants et a un pouvoir de pénétration élevé. C'est le cas des sources de Cobalt⁶⁰, qui émettent principalement deux photons d'une énergie de 1,17 et 1,33 MeV. L'interaction de la radiation peut aussi se faire par effet Compton. Dans ce cas-ci, contrairement à l'effet photoélectrique avec résonance, l'énergie du photon incident n'est pas totalement transférée à l'électron. Le photon perd de son énergie et est dévié de sa trajectoire après l'impact avec l'électron. Cet électron Compton est alors éjecté de l'atome et il n'y a pas de création d'électron Auger.

Des photons incidents d'une énergie entre 500 eV et 100 keV induiront principalement un effet photoélectrique. La prépondérance de l'effet photoélectrique augmente avec la masse de l'atome irradié. L'effet photoélectrique est dominant dans les éléments plus lourds à des énergies plus basses et augmente considérablement aux énergies correspondantes aux énergies de liaison des couches électroniques de l'élément irradié. La prépondérance de l'effet Compton, quant à elle, décroît très lentement lorsque l'énergie et le Z de la matière sont croissants, ce qui correspond seulement à une très légère variation. Donc, il est l'effet prédominant pour les atomes ayant une masse atomique (Z) et les énergies intermédiaires. Pour les Z inférieurs à 25, les deux effets sont induits suivant la même probabilité entre 10 et 100 keV. L'effet photoélectrique est l'interaction principale qui se produit lorsque le brome, possédant un Z de 35, est irradié avec des photons ayant une énergie en dessous de 200 keV (CHERRY et al., 2003).

L'irradiation X, si situant entre 25 et 10^5 eV (CHERRY et al., 2003), favorise quant à elle le mécanisme résonant, la génération et l'amplitude de la cascade d'électrons Auger. La résonance se produit à une énergie précise. Donc, idéalement la source de radiation utilisée pour induire ce mécanisme doit émettre des photons d'une énergie monochromatique. Cependant, la majorité des sources de rayons-x disponibles, comme par exemple le Therapax du Service de radio-oncologie du CHUS, émettent des rayons-x caractérisés par un spectre d'énergie comme celui illustré à la figure 10. L'énergie maximale correspond à l'énergie du photon le plus énergétique et l'énergie efficace représente l'énergie des photons les plus abondants. Ce rayonnement est d'ailleurs limité en surface (KARNAS et al., 1999).

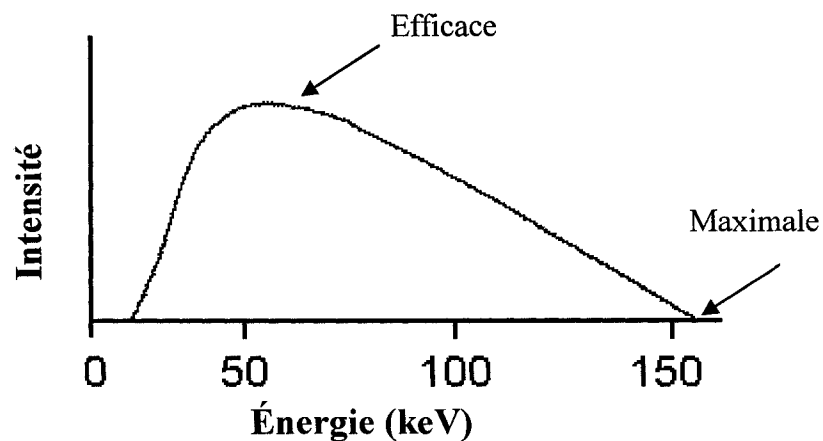


Figure 10. Représentation schématique du spectre d'énergie des photons émis par les irradiateurs conventionnels à rayons-x. L'intensité du rayonnement en fonction de l'énergie des photons émis. (Adaptée et modifiée de KARNAS et al., 1999).

Bien que ces sources polyénergétiques de rayons-x induisent un effet radiosensibilisant, l'optimisation de la création des dommages s'obtient avec l'irradiation X monochromatique, comme déjà observée avec le BrdU (LARSON et al., 1989), le cis-platine (BISTON et al., 2004)(LE SECH et al., 2001) et l'IdU (KARNAS et al., 1999).

6- Porphyrines

Des dérivés de métalloporphyrines cationiques peuvent s'avérer de bons candidats comme molécule porteuse d'atomes radiosensibilisants. Elles possèdent plusieurs caractéristiques pertinentes, mentionnées ci-dessous, que ce soit au niveau chimique, physique ou biologique.

6.1- Caractéristiques

Les porphyrines sont des molécules naturelles et endogènes. Elles entrent dans la composition de nombreux pigments et servent de base dans la formation de certaines molécules chez les organismes vivants, comme par exemple l'hème de l'hémoglobine sanguine. La structure d'une porphyrine est basée sur un macrohétérocycle constitué de quatre sous-unités pyrroles liées par quatre ponts de carbones (figure 11) (VICENTE, 2001).

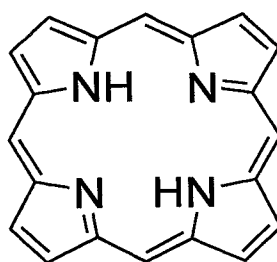


Figure 11. Structure chimique de porphyrine. Macrohétérocycle tétrapyrrolique lié par quatre ponts de carbones.

Le cycle aromatique formé est stable thermiquement, chimiquement et biologiquement. Il procure aussi aux porphyrines une couleur rougeâtre caractéristique et une fluorescence intrinsèque. Ces molécules possèdent plusieurs bandes d'absorption dans le

spectre optique. Elles absorbent majoritairement dans la partie rouge du visible (entre 600 - 800 nm). Ces composés ont également l'avantage de ne pas être toxiques lorsqu'ils ne sont pas soumis à la lumière (SCHAFFER et al., 2003).

6.2- Synthèses chimiques

La structure de base des porphyrines permet d'y faire une grande variété de modifications chimiques. Leurs propriétés peuvent être transformées en modifiant certaines réactions chimiques durant leur synthèse, influençant le caractère hydrophobe, la charge, la solubilité, l'affinité ou la pharmacocinétique de la drogue. Une variété de chaînes latérales (de longueur en carbone variable par exemple), de groupements chimiques (comme hydroxyles ou carboxyles) et d'atomes (plusieurs halogènes) peuvent y être fixés (HILMEY et al., 2002). Les porphyrines sont par conséquent de bonnes molécules porteuses puisqu'un grand nombre d'atomes radiosensibilisants, comme le brome, peuvent y être incorporé pour augmenter la probabilité de radiosensibilisation. Au niveau chimique, des complexes stables avec des ions métalliques, comme Fe, Co, Cu, Zn, Mn, peuvent être formés. Selon le métal présent au centre de la porphyrine, l'environnement électronique y sera altéré (LIM et al., 1984) et les diverses métalloporphyrines formées démontreront des propriétés variables, par exemple de radiosensibilisation (O'HARA et al., 1989).

6.3- Incorporation cellulaire

Les métalloporphyrines ont la capacité de pénétrer dans les cellules et se distribuer dans plusieurs compartiments cellulaires. Ces caractéristiques sont reliées à la présence de chaînes latérales et de groupements chargés qui modifient leur degré d'hydrophobicité (WOODBURN et al., 1991). Préférentiellement, les porphyrines anioniques s'accumule-

ront au niveau des lysosomes et de l'appareil de Golgi, alors que les porphyrines cationiques se logeront dans les mitochondries et le noyau. Le caractère amphiphile de la porphyrine améliorera son niveau d'accumulation cellulaire et sa diffusion dans le cytoplasme (VICENTE, 2001). Parmi ces cibles cellulaires, plusieurs peuvent être utilisés pour provoquer la mort cellulaire (FERRI & KROEMER, 2001).

6.4- Sensibilisation et rétention tumorale

Les porphyrines sont déjà employées *in vivo* comme photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique (TPD) et semblent offrir des sérieuses possibilités comme radiosensibilisateur pour la radiothérapie lors des traitements de cancers (SCHAFFER et al., 2003). Lors du traitement de TPD, les porphyrines peuvent induire de l'apoptose après l'exposition à la lumière rouge (DOLGACHEV et al., 2003). Leur effet radiosensibilisant est quant à lui très variable selon les molécules étudiées. Ainsi, les métalloporphyrines peuvent agir comme radiosensibilisateur et radioprotecteur (SCHAFFER et al., 2003)(O'HARA et al., 1989). Ces molécules peuvent avoir une activité catalytique pro ou antioxydante, dépendamment du potentiel de réduction relié au métal central. Ainsi, les porphyrines couplées au manganèse protègent les cellules contre les dommages faits par les espèces réactives de l'oxygène, générées suite à l'irradiation. Ces porphyrines agissent comme superoxide dismutase (SOD). Les porphyrines couplées au cobalt quant à elles semblent radiosensibilisantes (DO NASCIMENTO et al., 2005)(PEREZ & CEDERBAUM, 2002)(OHSE et al., 2001)(O'HARA et al., 1989).

Certaines porphyrines ayant démontré leur efficacité comme radiosensibilisateur, comme la Photofrin (SCHAFFER et al., 2002) et le Texaphyrin gadolinium (III) (MILLER et al., 1999), démontrent également une rétention préférentielle dans une variété de tumeurs *in vivo*. Les porphyrines font partie des composés, notamment les lipides et les macromolécules, présentant un « enhanced permeability and retention » (EPR). Ce phénomène est observé chez la plupart des tumeurs solides et n'est pas observé dans les tissus normaux. Il est causé par une angiogenèse extensive, une hyper vascularisation imparfaite et un drainage lymphatique défectueux. Certaines molécules dépendamment de leur masse moléculaire et de la clairance sanguine des tumeurs solides seront retenues spécifiquement et éliminer beaucoup moins rapidement au niveau tumoral (Noguchi et al., 1998)(Maeda et al., 2000). Donc, les porphyrines offrent un effet différentiel pour épargner les tissus sains.

6.5- Porphyrines cationiques et mitochondrie

Les molécules porteuses, en plus d'incorporer facilement les atomes radiosensibilisants, doivent posséder une structure adaptée à la cible cellulaire visée. Des chaînes latérales de carbones annexées aux métalloporphyrines cationiques leur confèrent la capacité de s'accumuler davantage dans la cellule. D'autre part, leurs charges positives leur confèrent une préférence pour la mitochondrie (CARRE et al., 1999). Ce tropisme serait relié à la charge négative de leur membrane externe à cause des phospholipides membranaires et surtout la chaîne de transport des électrons (COSTANTINI et al., 2000). La mitochondrie représente une cible de choix pour les radiosensibilisateurs étant une organelle clé dans l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque (YANG et al., 2003)(TAFANI et al., 2001).

7- Hypothèse et plan de travail

Le progrès technique et le développement prochain de molécules modifiant la réponse biologique pourraient améliorer le ratio thérapeutique associé aux traitements de radiothérapie du cancer du sein. L'utilisation d'une nouvelle classe de molécules porteuses d'atomes radiosensibilisants, ciblant les membranes cellulaires par exemple, pourrait permettre d'augmenter la mort cellulaire radio-induite. Plusieurs dérivés de métalloporphyrines cationiques bromées seront synthétisés, évalués et comparés afin de déterminer leur potentiel comme nouveaux radiosensibilisateurs pour la thérapie des cellules cancéreuses mammaires.

Un dérivé de porphyrine avec 16 bromes répartis équitablement en périphérie et au centre de la molécule, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, ainsi que son homologue sans cuivre central, posséderont deux bromes sur chacune de leurs quatre chaînes propyles latérales et huit bromes sur leur macrohétérocycle. Le dérivé de porphyrine $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ portera huit bromes uniquement sur ses groupements propényles périphériques et les huit bromes du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ seront ajoutés uniquement au centre de la porphyrine.

Suite à la synthèse de ces nouveaux radiosensibilisateurs, leur capacité radiosensibilisante sera déterminée afin de vérifier la pertinence des paramètres suivants: l'effet radiosensibilisant attribué aux atomes de brome sur le noyau de la porphyrine ou en périphérie de celle-ci, l'impact de l'énergie de la radiation et le rôle de l'atome central de cuivre. L'influence des chaînes latérales bromées sur l'accumulation cellulaire sera également mesurée ainsi que la stabilité structurale de ces porphyrines suite à l'irradiation.

Finalement, divers essais seront effectués afin de déterminer si l'augmentation de la radiosensibilité est associée à de l'induction d'apoptose.

8- Préambule

Avant d'en arriver à l'utilisation de radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines, une démarche a été suivie à travers laquelle divers composés bromés ont été testés. Un produit commercial chargé positivement et analogue à la rhodamine portant quatre bromes, le bromure tétrabromorhodamine (figure 12), et une série de phtalocyanines neutres (figure 13) synthétisées par l'équipe de notre collaborateur le Dr van Lier ont été les premières molécules testées. Bien que ces deux classes de composés n'ont pas conduit à des effets radiosensibilisateurs importants chez des cellules cancéreuses mammaires, ces études ont toutefois démontré qu'une faible augmentation des dommages cellulaires pouvait être induite *in vitro* par les atomes de brome, en comparaison avec leur homologue non bromé. Ces études ont aussi démontré l'importance de travailler avec des radiosensibilisateurs chargés afin d'assurer une bonne accumulation cellulaire.

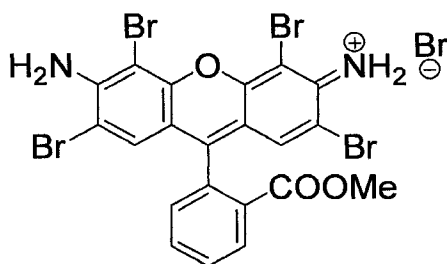


Figure 12. Structure chimique du bromure tétrabromorhodamine (www.probes.com).

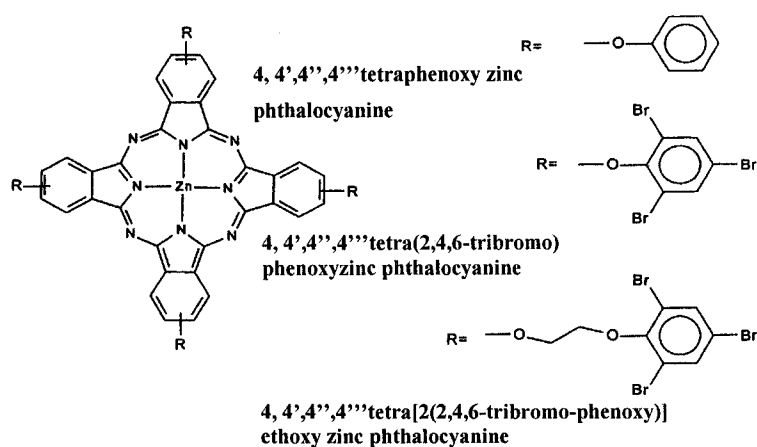


Figure 13. Structures chimiques et noms des phthalocyanines neutres.

Un troisième produit, l'acide 9,10,12,13,15,16-hexabromooctadécanoïque (figure 14), un homologue bromé commercial de l'acide stéarique, a permis de tester le concept de notre nouvelle approche thérapeutique. Le produit a augmenté le stress oxydatif *in vitro* et diminué la survie de cellules cancéreuses en combinaison avec la radiation. Ces résultats ont suggéré l'importance des bromes aliphatiques pour obtenir l'effet radiosensibilisant. Cependant, le fournisseur commercial de cet analogue bromé de l'acide stéarique ne parvenait pas à nous préparer des lots reproductifs entraînant des variations importantes de stabilité et de reproductibilité de nos résultats.

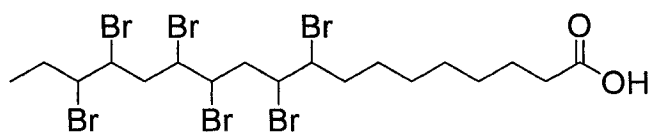


Figure 14. Structure chimique de l'acide 9,10,12,13,15,16-hexabromooctadécanoïque (www.sigmaaldrich.com).

Suite à ces informations partielles, notre étude sur le développement de nouveaux radiosensibilisateurs s'est tournée vers les métalloporphyrines cationiques comme molécules porteuses de nos atomes radiosensibilisants. La synthèse de ceux-ci s'est effectuée en collaboration avec le Dr Johan van Lier, son étudiant gradué Jean-Philippe Tremblay-Morin et le Dr Hasrat Ali.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture de cellules mammaires

La lignée cellulaire de carcinome mammaire humain MDA-MB-231 a été obtenue chez American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) et la lignée cellulaire de carcinome mammaire de souris MC7-L1 a été gracieusement offerte par le Dr Alfredo A. Molinolo (IBYME-CONICET, Buenos Aires). Les deux lignées cellulaires ont été maintenues dans du milieu de culture MEM supplémenté avec 10 % FBS, 1 mM pyruvate de sodium, 2 U/ml pénicilline G, 2 µg/ml streptomycine et 250 ng/ml amphotéricine B.

Synthèse des radiosensibilisateurs

La synthèse de ces radiosensibilisateurs a été effectuée par M Jean-Philippe Tremblay-Morin, étudiant en codirection avec les Drs van Lier et Paquette, dans le cadre de ces travaux de maîtrise. Un résumé des principales étapes est ici rapporté. Les précurseurs et les réactifs pour les synthèses, aussi bien que tous les autres produits chimiques, ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). Sur le [5,10,15,20-tetrakis(*N*-propénylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuP(PyPre)₄) (figure 15A), 16 bromes ont été ajoutés pour obtenir le [2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(*N*-(2,3-dibromopropyl)pyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuPBr₈(PyPrBr₂)₄) (figure 15B). Dans une seule et même réaction la molécule CuP(PyPre)₄ a été bromée; 2 bromes ont été ajoutés à chacun des 4 groupements propényles périphériques et 8 bromes sur le centre de la porphyrine. Deux autres porphyrines cationiques bromées ont aussi été synthétisées.

Sur le [5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuP(PyM)₄) (figure 15D), 8 bromes ont été ajoutés sur le centre de la porphyrine pour obtenir le [2,3,7,8,12,13,17,18-octabromo-5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuPBr₈(PyM)₄) (figure 15E). Tandis que le 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine a été utilisé pour obtenir un produit final ayant 8 bromes sur les groupements propényles périphériques, soit le [5,10,15,20-tetrakis(*N*-(2,3-dibromopropényl)pyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuP(PyPreBr₂)₄) (figure 15C). Les deux porphyrines homologues à ces derniers composés mais dont l'étape de bromation a été omise ont aussi été synthétisées et utilisées comme contrôles, soit les [5,10,15,20-tetrakis(*N*-propénylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuP(PyPre)₄) (figure 15A) et [5,10,15,20-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)porphyrinato]cuivre(II) (CuP(PyM)₄) (figure 15D).

Nous avons utilisé une porphyrine neutre comme précurseur, soit le 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrine (ou P(Py)₄), pour la synthèse de cette nouvelle classe de radiosensibilisateurs. La conversion du P(Py)₄ en analogue quaternaire comportant quatre chaînes *N*-bromoalkyl a été effectuée selon une séquence de réactions déjà établie (SANTRA et al., 2003). Lors de la première étape, les atomes d'azote du P(Py)₄ ont été alkylés par des chaînes hydrophobes en traitant le précurseur dans du DMF (24 heures à la température de la pièce) avec le bromure d'allyle. Le brome en position 1 a été utilisé comme groupe partant pour permettre le couplage de la partie propène sur l'azote du cycle pyridine. Le métal a été ajouté au produit quaternaire à l'aide du Cu(OAc)₂ dans méthanol/H₂O à reflux (pendant 2 heures). Le complexe cuivré a par la suite été traité avec du Br₂ dans le DMF (12 heures à la température de la pièce) pour ajouter les bromes

aux liaisons doubles des chaînes *N*-alkyles et aux positions β du centre de la porphyrine (Richards et al., 1996). Le produit final contenant 16 bromes ($\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$) a été purifié par précipitations successives. La pureté du produit a été vérifiée par analyses HPLC (Shimadzu, Man-Tech), équipé d'une colonne C18 PRP (Septra SDB-L, 255 Å, Phenomenex, Torrance, CA) en phase inverse. Un gradient linéaire de 30 à 70 % acétonitrile/tampon (10 mM TFA et 10 mM TEA, pH 2,6) en 30 minutes à un débit de 2 ml/minute a été utilisé. Les porphyrines ont été détectées à $\lambda = 435$ nm à l'aide d'un détecteur UV (Shimadzu, Man-Tech). Les produits ont été caractérisés par spectre de masse (MALDI-TOF).

La synthèse de $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ a été effectuée en remplaçant le bromure d'allyle dans la réaction par du 1,2,3-tribromopropène, après l'ajout du métal dans des conditions légèrement différentes. Aucune bromation supplémentaire n'a été effectuée sur cette molécule, puisque l'agent d'alkylation contenait des bromes. Pour le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$, avec seulement 8 bromes centraux, la quaternisation a été faite avec de l'iodométhane. Le $\text{H}_2\text{P}(\text{PyPre})_4$ était le produit de la réaction d'alkylation, soit avant l'ajout du cuivre. Le $\text{H}_2\text{PBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, la porphyrine avec 16 bromes sans cuivre, a été obtenu en traitant le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ en condition acide pour enlever le cuivre, tel que décrit par Richards (RICHARDS et al., 1996).

Étant donné la complexité d'effectuer la bromation sélectivement sur les liaisons doubles au centre de la porphyrine ou sur les liaisons doubles des chaînes latérales, il n'a pas encore été possible de synthétiser un composé bromé centralement avec des

groupements propényles périphériques non bromés. Toutefois, ce composé est en cours de synthèse. Donc, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ possède des chaînes externes méthylées comparativement aux chaînes propylées du $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ et du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$. Cette différence pourrait amener des variations, notamment sur l'accumulation cellulaire, mais les porphyrines bromées seront comparées à leur contrôle non bromé pour analyser l'effet de la présence de bromes. De plus, les deux contrôles non bromés ayant des chaînes latérales de longueur différente seront comparés pour voir l'influence de ces chaînes.

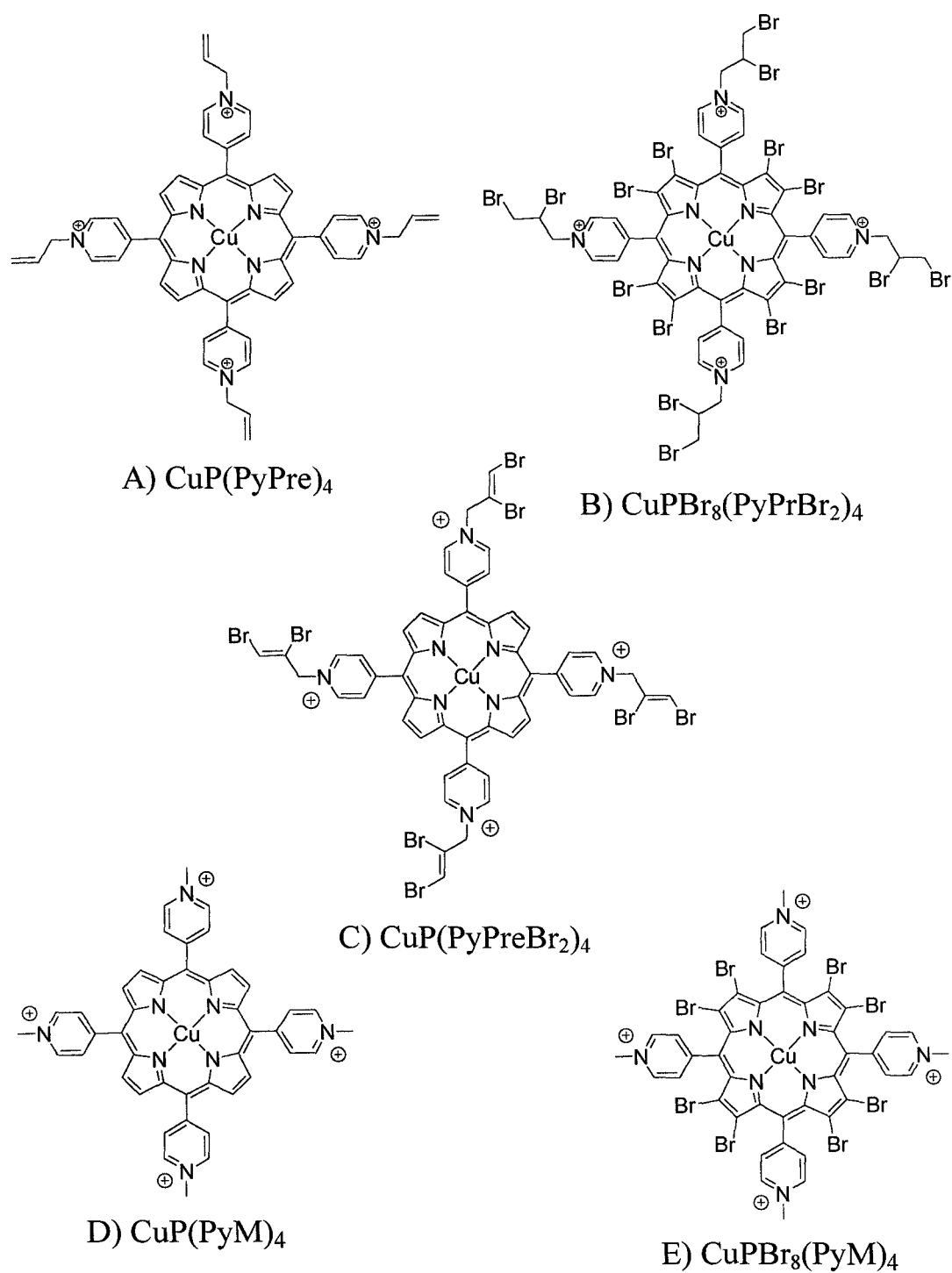


Figure 15. Structures chimiques et abréviations des porphyrines bromées et de leurs homologues non bromés.

Test de formation de colonies

Des tests de formation de colonies ont été employés pour évaluer l'effet des radiosensibilisateurs dérivés de porphyrines sur la survie des cellules cancéreuses. Les solutions stocks de porphyrines (2 à 2,5 mM) ont été fraîchement préparées dans du DMSO et diluées dans du milieu de culture sans sérum. Brièvement, 500 cellules dans leur phase logarithmique de croissance ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 60mm avec du milieu de culture supplémenté de 10 % FBS et incubées pendant 18 heures à 37°C / 5 % CO₂ pour permettre leur attachement. Les cellules ont ensuite été incubées avec les porphyrines modifiées pendant 4 heures dans du MEM sans sérum. Subséquemment, les porphyrines ont été retirées et du milieu de culture complet a été ajouté. Après l'irradiation, les cellules ont été incubées pendant 10 à 14 jours. La chronologie a été inversée pour l'essai des porphyrines pré-irradiées avant le traitement des cellules. Le BrdU a aussi été testé et la thymidine a été utilisée comme contrôle négatif. Ces composés obtenus de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) ont été préalablement dissous à 300 µM dans l'eau et testés à 10 µM. Le temps d'adhérence a été de 4 heures et le temps d'incubation de 24 heures avec du milieu de culture MEM supplémenté de FBS.

Trois protocoles d'irradiation ont été employés, soit l'utilisation d'un irradiateur au ⁶⁰Co (Gammacell 220, Atomic Energy of Canada Limited) émettant principalement deux rayons gamma (1,17 et 1,33 MeV) et un générateur de rayons-x (Therapax, Pantax) ajusté pour donner des énergies maximales et efficaces de 30 keV/14,8 keV ou de 150 keV/70,1 keV. Après la coloration au cristal violet, les colonies ayant plus de 50 cellules ont été comptées. Le pourcentage de survie a été corrigé pour l'effet toxique de chaque drogue

sans rayonnement. Chaque analyse a été répétée de 3 à 6 fois et la moyenne +/- l'écart type a été utilisée pour présenter les résultats. L'analyse statistique a été exécutée à l'aide du test Student-t et les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme étant significatives. Lorsqu'il est fait mention du % de réduction de survie cellulaire par les composés bromés, ce % a été calculé comme suit :

$$\frac{\% \text{ de survie du contrôle non-bromé} - \% \text{ de survie du composé bromé}}{\% \text{ de survie du contrôle non-bromé}}$$

Accumulation cellulaire des radiosensibilisateurs

L'accumulation cellulaire des radiosensibilisateurs a été déterminée après l'incubation des cellules MDA-MB-231 avec 10 μM de chacune des trois porphyrines bromées et de leur homologue non bromé pendant 4 heures dans du milieu de culture MEM sans sérum. Ensuite, les cellules ont été lavées au PBS pH 7,4, récoltées avec 0,02 % de pancréatine, resuspendues dans du tampon de lyse (0,6 % SDS et 0,1 M EDTA pH 7,4), incubées 18 heures à 4°C et centrifugées à 13000 RPM pendant 10 minutes. Les surnageants ont été collectés. La concentration en protéine a été déterminée avec le Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA) et les porphyrines ont été quantifiées à l'aide d'un spectrophotomètre HITACHI U-2000. Le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde d'absorption maximale a été recalculé dans le tampon de lyse. Les résultats sont présentés en mol de drogue / mg de protéines. Les cellules incubées sans porphyrine ont été utilisées comme bruit de fond.

Stabilité structurale sous rayonnement

La stabilité des radiosensibilisateurs après irradiation a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre HITACHI U-2000 et un HPLC, comme mentionné pour la pureté et l'homogénéité lors de la synthèse. Les porphyrines ont été dissoutes et diluées dans de l'eau à partir de 1 μM jusqu'à 100 μM et irradiées au ^{60}Co à des doses allant de 2 à 1000 Gy. Par la suite, les drogues ont été analysées dans de l'eau, à l'exception de $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$. Cette dernière a été diluée dans le DMSO après l'irradiation puisqu'elle possède une solubilité moindre et une tendance plus grande à l'empilement en solution aqueuse, ce qui peut modifier l'absorbance. Les autres porphyrines absorbent de façon relativement identique suite à des dilutions subséquentes dans l'eau ou dans un solvant polaire comme le DMSO. Les spectres d'absorption et les chromatogrammes HPLC des composés irradiés ont été comparés à ceux obtenus avec les contrôles non irradiés.

Potentiel membranaire de la mitochondrie

La variation du potentiel membranaire de la mitochondrie a été mesurée avec une sonde fluorescente spécifique à la mitochondrie, le Mitotracker®Red CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR) (LEIRA et al., 2002)(LEIRA et al., 2001). Approximativement, 5000 cellules MDA-MB-231 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits noir à fond clair (Corning, NY) et incubées pendant 24 heures. Les cellules ont été par la suite incubées pendant 4 heures supplémentaires en présence d'un radiosensibilisateur et irradiées à la dose indiquée avec l'irradiateur au ^{60}Co . Suite à l'irradiation, de 0,25 à 72 heures, les microplaques ont été centrifugées pour prévenir le détachement des cellules et

50 µl de milieu de culture ont été retirés pour être remplacés par 50 µl de la solution de Mitotracker®Red. La concentration finale de la sonde était de 1 µM. Les cellules ont été incubées pendant 45 minutes à 37°C, centrifugées, lavées avec du HBSS, centrifugées une seconde fois et remises dans du HBSS pour effectuer les lectures. La fluorescence a été mesurée dans un lecteur de plaque 96 puits Synergy HT (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT) avec une $\lambda_{ex} = 530$ nm et $\lambda_{em} = 590$ nm. Les valeurs relatives de fluorescence (RFU) pour les cellules incubées en présence de porphyrines et irradiées ont été normalisées avec les valeurs obtenues pour les cellules non irradiées, mais traitées avec la même porphyrine. Ensuite, l'effet d'une porphyrine a été comparé au contrôle sans drogue. En conséquence, les résultats ont présenté l'effet combiné de la porphyrine et des radiations, et sont exprimés en incorporation cellulaire normalisée avec le contrôle sans drogue (%) du colorant Mitotracker®Red.

Détection d'apoptose par cytométrie à flux

Des essais de cytométrie à flux avec l'Annexine-V ont été utilisés pour détecter la translocation des phosphatidylsérines de l'intérieur du feuillet de la membrane plasmique vers l'extérieur chez les cellules en apoptose. Cet événement survient de façon précoce durant l'apoptose, mais l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue plus longtemps (LEIRA et al., 2002).

Suivant une pré-incubation de 18 heures dans des boîtes de Pétri de 60mm, 100 000 à 200 000 cellules MDA-MB-231 ont été incubées pendant 4 heures avec l'un des

radiosensibilisateurs puis incubées de 1 à 72 heures post-irradiation aux doses de radiation indiquées. Les cellules incubées sans porphyrine et/ou non irradiées ont aussi été analysées. Comme contrôle positif, les cellules ont été exposées 24 heures à l'inducteur d'apoptose staurosporine (1 μ M), un inhibiteur non spécifique de tyrosine kinases (TAFANI et al., 2001)(XU et al., 1995). Ensuite, selon les instructions du manufacturier, les cellules ont été récoltées avec 0,02 % de pancréatine, lavées avec du PBS pH 7,4 froid et resuspendues dans du tampon de fixation d'Annexine V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl et 2,5 mM CaCl_2 , pH 7,4) à une densité de 1×10^6 cellules / ml. Un volume de 100 μ l de suspension cellulaire a par la suite été incubé 15 minutes, à la température de la pièce et protégé de la lumière, avec 2,5 μ l d'Annexine V-FITC et 1 μ g / ml d'iodure de propidium (Molecular Probes, Eugene, OR), un indicateur de mort cellulaire. Le volume a été complété jusqu'à 150 μ l avec du tampon de fixation d'Annexine V et les échantillons gardés sur glace. L'intensité de la fluorescence a été analysée avec un cytomètre à flux FACScan® Flow Cytometer (Becton Dickinson). La fluorescence dans le vert du FITC a été détectée dans le canal FL1 et le canal FL2 a servi pour la fluorescence rouge de l'iodure de propidium.

Détection d'apoptose par coloration des acides nucléiques au YO-PRO®-1

Le marqueur fluorescent YO-PRO®-1 iodide (Molecular Probes, Eugene, OR) a été utilisé pour vérifier si les porphyrines bromées augmentaient l'apoptose induite par les radiations. Les essais ont été effectués comme décrit précédemment par Wronski (WRONSKI et al., 2002) avec de légères modifications. Les cellules ont étéensemencées, incubées avec les porphyrines bromées et irradiées de la même manière que pour la mesure de variation du potentiel membranaire. Les microplaques ont ensuite été centrifugées, le milieu a complètement été retiré, 50 µl de solution colorante ont été ajoutés (5,6 µg/ml YO-PRO®-1 iodide et 20 µg/ml d'iodure de propidium dans du PBS pH 7,4) et les cellules ont été placées sur glace pendant 30 minutes à la noirceur. Les RFU ont été par la suite mesurées dans un lecteur de plaque 96 puits Synergy HT (Bio-Tek Instrument, Winooski, VT) avec $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ pour le YO-PRO®-1 et $\lambda_{\text{em}} = 645 \text{ nm}$ pour l'iodure de propidium. Les résultats ont été analysés comme pour la variation du potentiel de la membrane et exprimés en incorporation cellulaire normalisée (%) des colorants.

RÉSULTATS

Radiosensibilisation par une porphyrine cationique bromée, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$

La capacité radiosensibilisante de la porphyrine cationique bromée $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a été déterminée sur les cellules cancéreuses du sein MDA-MD-231 à l'aide d'un test de formation de colonies. Ce radiosensibilisateur potentiel, sur lequel 16 bromes ont été rattachés, a été comparé au $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$, son homologue non bromé. Trois sources de radiation, des rayons-x à 14,8 keV, des rayons-x à 70,1 keV et un rayonnement gamma (^{60}Co) ont été utilisées pour délivrer des doses de 1, 2 et 3,5 Gy (figure 16). Les doses choisies afin d'effectuer les courbes de survie et analyser l'effet des radiosensibilisateurs bromés potentiels dérivants de porphyrines se retrouvent globalement dans la zone des doses utilisées en clinique, allant de 2 à 3,3 Gy (HORTON et al., 2005)(COSSET, 2005).

L'efficacité de clonage des cellules MDA-MB-231 est de 25 % dans les conditions utilisées, correspondant à environ 150 cellules pour le contrôle sans drogue et sans radiation. Ce dernier a été considéré comme correspondant à 100 % de survie cellulaire. Les valeurs de survie cellulaire présentées dans les graphiques ont été corrigées pour la toxicité induite par les composés sans radiation. Les survies sans radiation pour chacune des drogues ne sont donc pas illustrées dans les graphiques, puisque qu'elles ont servi aux calculs corrigés.

Dans les trois graphiques, les valeurs de survie cellulaire ont été similaires (figure 16A, B et C). Le contrôle sans drogue a démontré une diminution de la survie cellulaire

en fonction de la dose de radiation passant de 80 % de survie à 1 Gy jusqu'à une survie d'environ 20 à 30 % à 3,5 Gy. En comparaison au contrôle sans drogue, le CuP(PyPre)₄ non bromé n'a pas modifié significativement la survie cellulaire, peu importe l'énergie des photons de la source de radiation utilisée. À l'inverse, l'addition de bromes sur la métalloporphyrine cationique a conduit à une réduction substantielle de la survie cellulaire. L'effet radiosensibilisateur du CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ a été observé à une dose aussi faible que 1 Gy, réduisant à une valeur de 45 - 50 % la survie cellulaire et celle-ci est devenue pratiquement nulle à 3,5 Gy. Les résultats obtenus avec le CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ supportent le rôle des bromes lors de la radiosensibilisation et la relation entre l'intensité de l'effet et la dose de radiation. L'addition des bromes doublant l'efficacité de la radiation seule.

Afin de mieux analyser l'effet du radiosensibilisateur CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ en fonction des trois sources de radiation, la survie respective à 2 Gy a été comparée plus explicitement. Les résultats de survie à 2 Gy ont été mis en valeurs plus particulièrement puisque c'est la dose de choix dans la majorité des traitements cliniques conventionnels en doses fractionnées du cancer du sein (WHELAN et al., 2002) et la dose de référence majoritairement utilisée dans les courbes de survie *in vitro* pour déterminer la radiosensibilité des lignées cellulaires. En absence de drogue, les trois sources ont mené à une survie des cellules MDA-MB-231 similaire, i.e environ 50 % (figure 16A, B et C). La survie n'a pas varié de façon significative suite à l'irradiation du contrôle sans brome. La radiosensibilisation la plus efficace à 2 Gy par le CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ a été obtenue avec les rayons-x de 14,8 keV, avec une réduction de 76,6 % de la survie cellulaire comparativement au contrôle sans brome (figure 16A). La réduction de survie avec les autres sources de radia-

tion ont été d'environ 53,8 % avec les rayons-x de 70,1 keV (figure 16B) et de 48,4 % avec le ^{60}Co (figure 16C). Ces résultats peuvent suggérer que le mécanisme résonant soit prédominant sur le mécanisme non résonant; par contre, la radiosensibilisation plus importante apportée par le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ avec les rayons-x de 14,8 keV n'a pas été significativement différente comparativement aux deux autres sources de radiation.

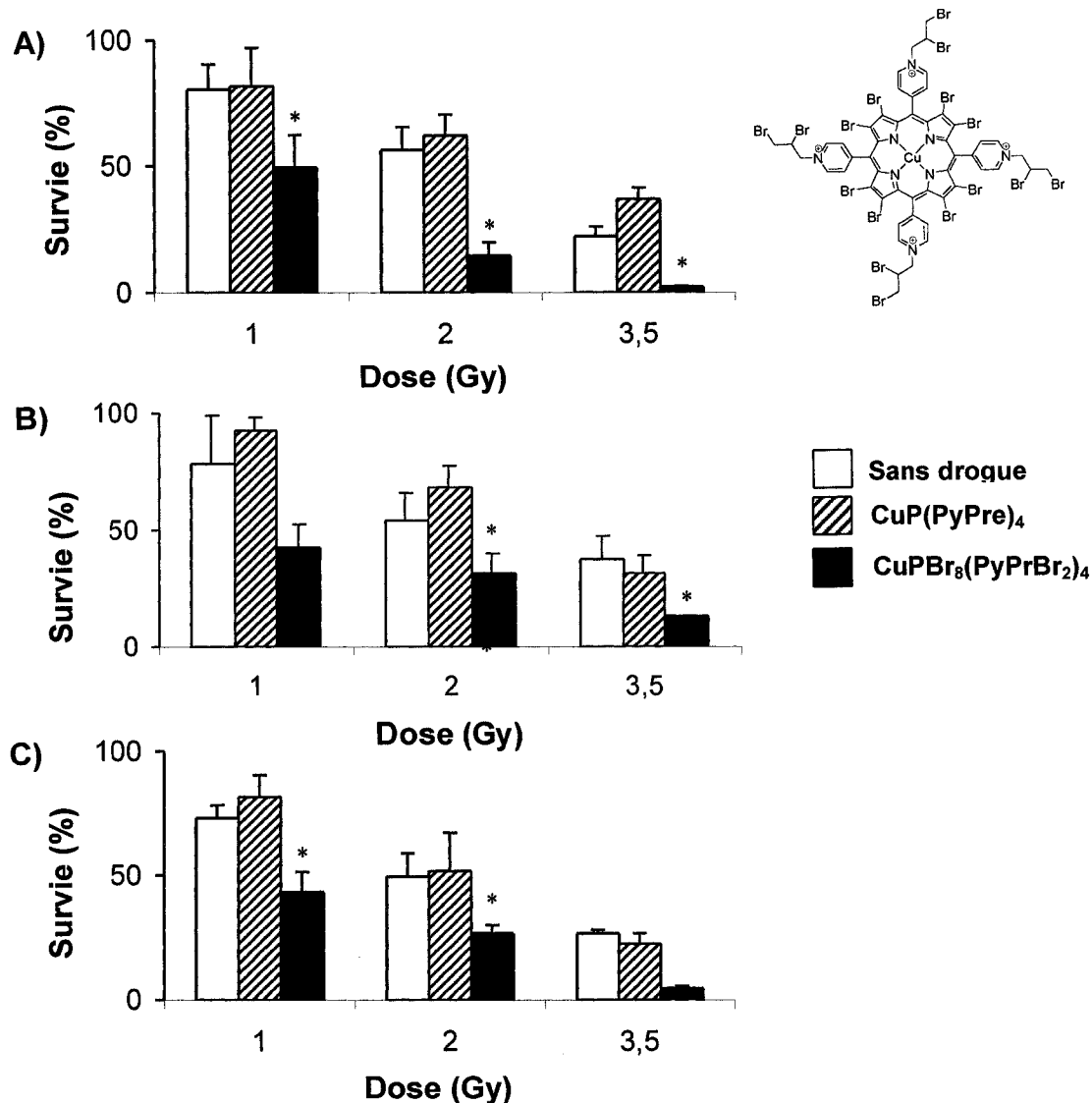


Figure 16. Effet du radiosensibilisateur CuPBr₈(PyPrBr₂)₄, portant 16 bromes, sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 en fonction de la dose de radiation. Les cellules cancéreuses ont été incubées pendant 4 heures avec la drogue à 10 μ M et irradiées par la suite à 1, 2 et 3,5 Gy avec (A) les rayons-x (14,8 keV), (B) les rayons-x (70,1 keV) ou (C) le ⁶⁰Co. Les cellules incubées avec l'homologue non bromé, le CuP(PyPre)₄, et sans drogue ont été utilisées comme contrôles. *Valeurs significatives vs le contrôle de cellules sans drogue et le contrôle de cellules avec porphyrine non-bromée irradiés aux doses correspondantes, $p < 0,05$.

Le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a démontré précédemment un effet radiosensibilisant à 10 μM , mais le pouvoir radiosensibilisateur de cette drogue irradiée à 2 Gy de ^{60}Co a aussi été étudié en fonction de sa concentration (figure 17). Tout comme les résultats illustrés à la figure 16, la radiosensibilisation rapportée à la figure 17 a été corrigée pour tenir compte du faible niveau de toxicité induit par ces composés sans radiation. La modification de la concentration du contrôle $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$ n'a pas eu d'impact sur la valeur de survie. Dans le cas du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, un effet radiosensibilisant significatif a pu être observé à partir d'une concentration de 7,5 μM , une légère variation est toutefois apparue à 2,5 μM . La réduction de survie cellulaire engendrée par le radiosensibilisateur, comparativement au contrôle sans brome utilisé à la même concentration, est passée de 22,4 % à 48,4 % entre 5 μM et 10 μM . La drogue a aussi été testée à 15 μM , mais cette concentration a été trop toxique sans radiation pour que son analyse soit poursuivie.

En résumé, ces résultats ont démontré que l'addition des bromes sur la porphyrine cationique lui donnait l'aptitude pour réduire la survie des cellules cancéreuses mammaires après l'irradiation. Les conditions expérimentales de 2 Gy délivrés par l'irradiateur au ^{60}Co et 10 μM de drogue ont été utilisées pour les essais suivants.

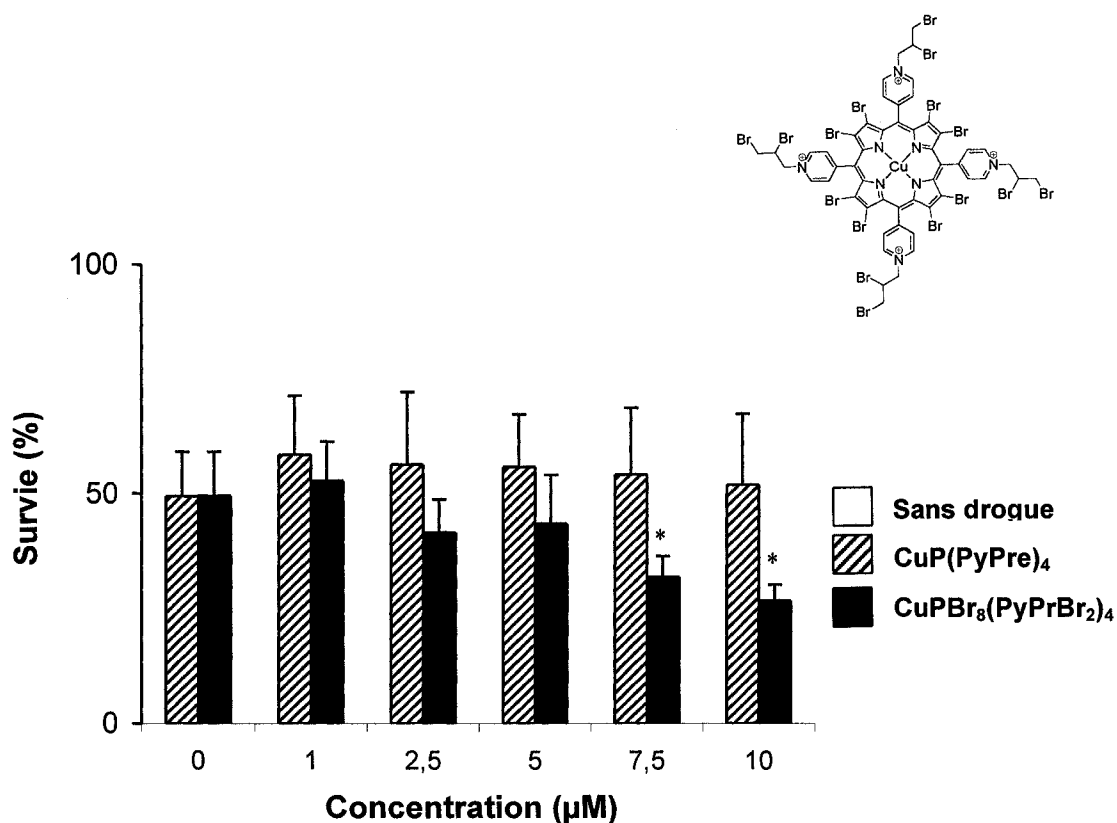


Figure 17. Effet de la concentration du radiosensibilisateur $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, portant 16 bromes, sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées 4 heures en présence de 1 à 10 μM de drogue avant d'être irradiées à 2 Gy de ^{60}Co . Les cellules incubées avec l'homologue non bromé, le $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$, et sans drogue ont été utilisées comme contrôles. *Valeurs significatives vs le contrôle de cellules sans drogue et le contrôle de cellules avec porphyrine non-bromée à la concentration correspondante, $p < 0,05$.

Indépendance de la présence de l'atome de cuivre au centre de la porphyrine cationique bromée dans le processus de radiosensibilisation

Le dérivé de porphyrine cuivré portant 16 bromes $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a ensuite été comparé à un homologue de porphyrine ne contenant pas de cuivre au noyau aromatique central afin de déterminer l'impact de ce dernier sur le processus de radiosensibilisation. La comparaison entre la porphyrine sans cuivre $\text{H}_2\text{PBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, est rapportée à la figure 18. Les % de survie cellulaire ont également été corrigés pour la toxicité des composés sans radiation.

Aucun changement significatif n'a été mesuré entre les contrôles non bromés $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$ (figure 18A) et $\text{H}_2\text{P}(\text{PyPre})_4$ (figure 18B) sur la survie cellulaire des MDA-MB-231 irradiées au ^{60}Co . La survie à 2 Gy est restée à une valeur d'environ 50 %, soit le même niveau qui a été obtenu en irradiant les cellules seules sans porphyrines. Concernant les porphyrines bromées, une réduction similaire de la survie cellulaire, soit d'environ 50 %, a été mesurée pour la porphyrine cuivrée (figure 18A) et celle sans cuivre (figure 18B), comparativement aux contrôles sans brome. Donc, la présence du cuivre au centre de la porphyrine n'était pas impliquée dans la radiosensibilisation. De plus l'absence de cuivre au centre de la porphyrine conférait à la molécule une toxicité nettement plus marquée et une instabilité en solution détectée par lecture d'absorbance et variation d'effet cellulaire en fonction de l'âge du composé. En conséquence, seulement le couple radiosensibilisateur/contrôle complexé au cuivre a été conservé pour la suite de l'étude.

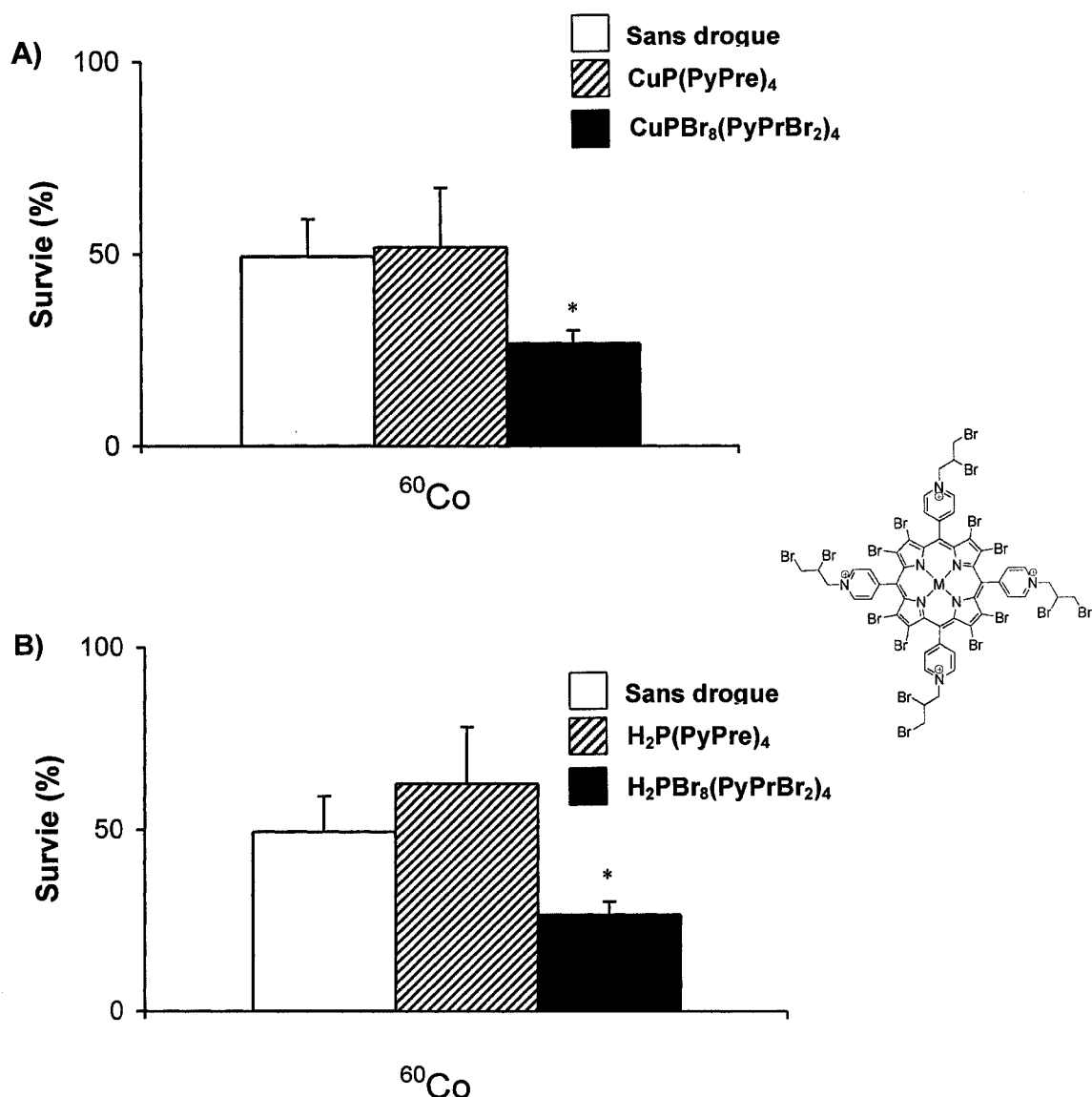


Figure 18. Effet du radiosensibilisateur dérivé de porphyrine possédant 16 bromes sans cuivre central, comparativement au dérivé avec un atome de cuivre central, sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec 10 μ M de (A) CuPBr₈(PyPrBr₂)₄, la porphyrine cuivrée au centre ou (B) H₂PBr₈(PyPrBr₂)₄, la porphyrine sans cuivre au centre. Les cellules ont ensuite été irradiées à 2 Gy de ⁶⁰Co. Comme contrôles, les cellules ont aussi été incubées sans porphyrine ou avec l'homologue de porphyrine sans brome. *Valeur significative vs le contrôle de cellules sans drogue et le contrôle de cellules avec porphyrine non-bromée, $p < 0,05$.

Rôle de la localisation des bromes sur la porphyrine cationique dans le processus de radiosensibilisation

Le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$, un dérivé de porphyrine portant 8 bromes sur ses groupements propényles périphériques, et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$, un dérivé avec 8 bromes sur le centre aromatique de la porphyrine, ont été comparés pour déterminer l'effet de la position des bromes de la métalloporphyrine cationique sur sa capacité radiosensibilisante. Cette expérience a donc permis de déterminer quels bromes sur le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sont impliqués dans le processus de radiosensibilisation. Les résultats à 10 μM et 2 Gy de ^{60}Co sont présentés à la figure 19.

Le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ a mené à une survie cellulaire de 35 % (figure 19A) ce qui représente une baisse d'environ 44,9 % comparativement au contrôle non bromé CuP(PyPre)_4 . Inversement, aucune radiosensibilisation n'a été observée avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ (figure 19B), la survie cellulaire demeurant à environ de 50 %. Ces résultats supportent que les bromes périphériques soient responsables de la radiosensibilisation. Ces données concordent aussi avec des expériences antérieures non présentées. Elles ont porté sur l'analyse du bromure tétrabromorhodamine, de phtalocyanines neutres et de l'acide 9,10,12,13,15,16-hexabromooctadécanoïque et ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'ajout de bromes sur un cycle aromatique ne conférerait pas de pouvoir radiosensibilisateur. Les deux contrôles non bromés, le CuP(PyPre)_4 ou le CuP(PyM)_4 , n'ont pas modifié la survie cellulaire, supportant l'absence d'induction de toxicité cellulaire et de radiotoxicité des groupements alkyles sur la porphyrine. L'effet radiosensibilisateur rapporté a été corrigé pour le faible effet toxique de ces composés sans radiation.

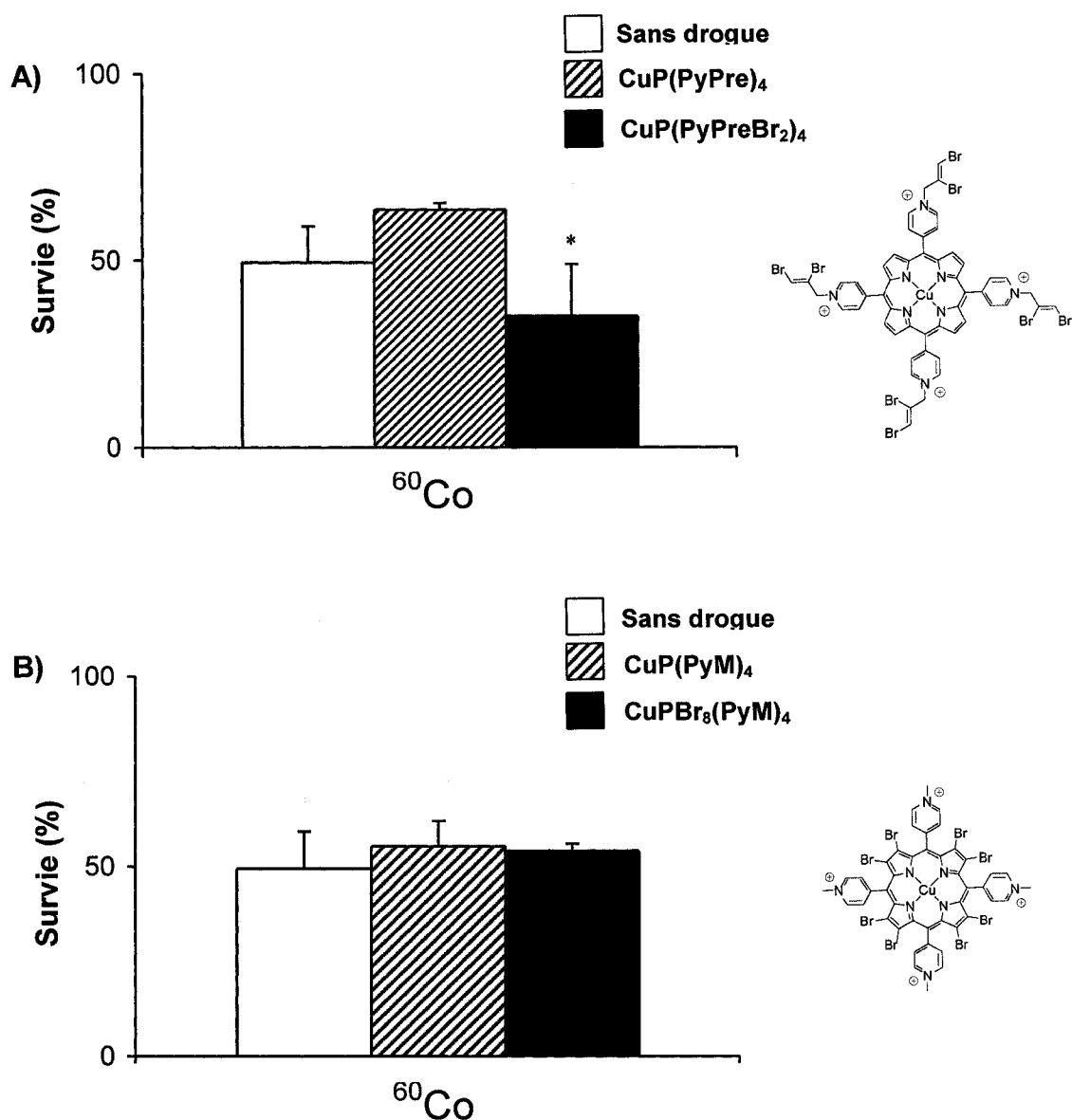


Figure 19. Effet de la position des bromes sur la radiosensibilisation de dérivés de porphyrine sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées avec (A) CuP(PyPreBr₂)₄, une porphyrine portant 8 bromes sur les groupements propényles périphériques, ou (B) CuPBr₈(PyM)₄, une porphyrine avec 8 bromes au centre de la molécule. Les 2 drogues ont été utilisées à 10 μM pendant 4 heures. Les cellules ont ensuite été irradiées à 2 Gy de ⁶⁰Co. Comme contrôles, les cellules ont été incubées sans porphyrine ou avec la porphyrine non bromée correspondante. *Valeur significative vs le contrôle avec porphyrine non-bromée, p < 0,05.

Ratios radiosensibilisateurs des porphyrines bromées cationiques

L'effet radiosensibilisant a été jusqu'à présent rapporté en comparant la survie cellulaire obtenue avec une porphyrine bromée avec celle de son homologue non bromé, afin de faire ressortir l'impact de l'addition des bromes. L'effet radiosensibilisateur globale, soit en fonction du traitement sans aucune drogue, a aussi été calculé obtenant ainsi le ratio radiosensibilisateur (RRS). Les RRS des porphyrines cationiques bromées en périphérie sur les cellules MDA-MB-231 à 2 Gy de ^{60}Co ont été comparés aux RRS des autres porphyrines testées dans cette étude (Table 1). Les RRS ont été obtenus à partir des données d'essais de survies cellulaires et calculés comme suit :

Survie des cellules non-traitées et irradiées /Survie des cellules non-traitées non-irradiées

Survie des cellules traitées et irradiées /Survie des cellules traitées et non-irradiées

Traitées : Incubation avec les porphyrines bromées

Non-traitées : Incubation sans drogue

Ce calcul permet de classer l'effet radiosensibilisant des porphyrines selon l'ordre suivant : $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4 \cong \text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4 \gggg \text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$. Des RRS identiques pour le $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$ et le $\text{CuP}(\text{PyM})_4$ ont obtenu, soit près de 1. D'autre part, le calcul des RRS du $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ permet de dégager une tendance voulant que l'effet radiosensibilisant croît avec la concentration du radiosensibilisateur. Des RRS croissants entre 7,5 et 10 μM ont aussi été obtenu pour le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, toutefois avec de trop grands écart-types pour affirmer la même tendance avec certitude. Cependant, suite aux calculs effec-

tués avec une série de quatre valeurs de survie cellulaire pour obtenir les RRS, les écart-types sur les RRS sont surévalués en comparaison avec ceux des survies cellulaires.

La comparaison de ces ratios est également venue appuyer l'absence d'implication des bromes centraux sur la porphyrine. Lorsque seuls les bromes internes sont présents, les RRS du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ sont associables à un effet radiosensibilisant nul. D'autre part, les RRS ont été pratiquement identiques pour les porphyrines ayant leurs bromes seulement en périphérie ou soit la combinaison des bromes centraux et en périphérie.

TABLE 1

Ratios radiosensibilisateurs (RRS) des porphyrines bromées cationiques sur les cellules MDA-MB-231 irradiées à 2 Gy de ^{60}Co

Traitement	Concentration		
	RRS (7,5 μM)	RRS (10 μM)	RRS (25 μM)
$\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$	$1,52 \pm 0,46$	$1,79 \pm 0,36$	N/D
$\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$	$1,57 \pm 0,19$	$1,69 \pm 0,22$	$2,22 \pm \text{N/D}$
$\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$	$0,81 \pm 0,48$	$0,89 \pm 0,14$	$1,02 \pm 0,36$

Notes : Les cellules ont été traitées pendant 4 heures avec les drogues dans du milieu de culture sans sérum avant l'irradiation.

Les valeurs sont exprimées : moyenne \pm l'écart-type.

Le RRS du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ à 25 μM n'est pas disponible, la molécule s'étant avérée cytotoxique au-delà de 15 μM .

Toxicité cellulaire des porphyrines cationiques sans radiation

Afin de mieux analyser la possibilité d'une éventuelle application clinique de ce type de composé, les pouvoirs toxiques des porphyrines testées dans cette étude ont été comparés. Les toxicités à 10 μM de drogue sans radiation sur les cellules MDA-MB-231 sont donc présentées à la table 2. Ces valeurs ont d'autre part été utilisées dans les calculs pour la correction des survies cellulaires présentées précédemment.

Les trois contrôles non bromés, soit CuP(PyPre)_4 , CuP(PyM)_4 et $\text{H}_2\text{P(PyPre)}_4$ ont démontré une toxicité cellulaire nulle (Table 2). Le $\text{H}_2\text{P(PyPre)}_4$ a même engendré une survie cellulaire plus élevée que le contrôle, respectivement de 130 %. Cette variation n'est toutefois pas significative, mais seulement due à une plus faible stabilité du produit. C'est d'ailleurs une des raisons pourquoi les porphyrines non cuivrées ont été abandonnées.

Les porphyrines possédant huit bromes, soit 8 sur les chaînes périphériques ($\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$) ou huit sur le centre de la molécule ($\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$), ont présenté une très légère variation non significative de toxicité. Cette variation se situant entre 5 – 8 % à la hausse ou à la baisse, il est possible d'affirmer que ces deux drogues n'ont aucun effet néfaste sur la survie cellulaire sans radiation.

Finalement, les deux seules porphyrines ayant démontré une toxicité marquée sont celles portant 16 bromes. La toxicité du $\text{H}_2\text{PBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a été plus importante que celle du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, ce qui concorde avec la variabilité du contrôle non bromé correspondant. Une telle toxicité ne pourrait être acceptable en dehors d'une étude *in vitro*. La toxi-

cité pourrait être diminu e avec certaines modifications chimiques sur la molécule et une analyse de structure/activité.

Bref, ces résultats indiquent qu'avec une étude plus exhaustive de toxicité, une utilisation clinique potentielle du radiosensibilisateur CuP(PyPreBr₂)₄ serait envisageable.

TABLE 2

Toxicité des porphyrines brom es cationiques sur les cellules MDA-MB-231

Traitement	Toxicité(%)
	10 μ M
Sans drogue	0,0 \pm 0,0
CuP(PyPre) ₄	- 1,6 \pm 5,4
CuPBr ₈ (PyPrBr ₂) ₄	80,0 \pm 12,7
CuP(PyPreBr ₂) ₄	- 8,6 \pm 11,3
CuP(PyM) ₄	- 0,3 \pm 16,7
CuPBr ₈ (PyM) ₄	5,6 \pm 12,0
H ₂ P(PyPre) ₄	- 30,0 \pm 27,5
H ₂ PBr ₈ (PyPrBr ₂) ₄	92,1 \pm 13,7

Notes : Les cellules ont été trait es pendant 4 heures avec les drogues dans du milieu de culture sans sérum.

La survie des cellules MDA-MB-231 sans porphyrine a été utilis e comme contrôle.

Les valeurs sont exprim es : moyenne \pm l'écart-type.

Radiosensibilisation des cellules MDA-MB-231 par le BrdU

Les analogues de pyrimidines, comme le BrdU, sont parmi les radiosensibilisateurs les plus étudiés et ont été testés en clinique (PIGNOL et al., 2003). Ce composé a aussi été ajouté à notre étude afin de servir de comparaison avec nos nouveaux radiosensibilisateurs. L'effet du BrdU a été mesuré par test de formation de colonies à la même concentration que les porphyrines bromées (10 μ M) et incubé pendant 24 heures pour permettre son incorporation dans l'ADN (MARKS et al., 2002), comparativement à 4 heures pour les porphyrines bromées. Le radiosensibilisateur a également été comparé à son homologue non bromé, la thymidine. L'effet de ces deux drogues soumises aux rayons-x de 14,8 keV et aux rayons gamma (^{60}Co) est rapporté à la figure 20. Ces résultats ont été corrigés afin de tenir compte de la toxicité des composés sans radiation.

En présence de thymidine et irradiées à 2 Gy, comparativement aux valeurs obtenues sans drogue, les cellules MDA-MB-231 ont démontré une élévation de la survie cellulaire avec les deux sources de radiation. Quoique l'élévation amenée par la thymidine est plus grande à 14,8 keV, elle n'est pas significative (figure 20). Quant au BrdU, il a engendré 10 % de survie avec les rayons-x de 14,8 keV, correspondant à une diminution de 88,5 % de la survie cellulaire comparativement à la thymidine. Tandis qu'avec le ^{60}Co , le BrdU a engendré une réduction de 74,2 % de la survie des cellules comparativement à la thymidine.

La radiosensibilisation par le BrdU sur les cellules MDA-MD-231 a suivi la même tendance que celle observée avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$. L'efficacité du radiosensibilisa-

teur bromé avec les rayons-x à 14,8 keV était plus importante que celle mesurée avec le ^{60}Co , suggérant la prédominance du mécanisme résonant sur le mécanisme non résonant. Cependant, tout comme pour les porphyrines bromées, cette différence de radiosensibilité obtenue avec les deux sources de radiation n'a pas été significative.

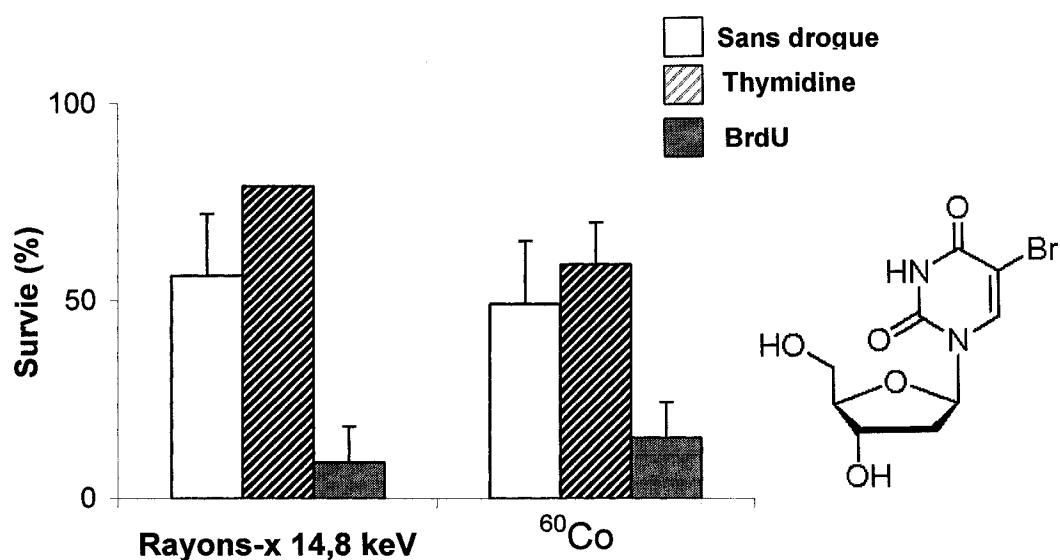


Figure 20. Effet du radiosensibilisateur BrdU sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules cancéreuses ont été incubées pendant 24 heures avec la drogue à 10 μ M et irradiées par la suite à 2 Gy avec les rayons-x (14,8 keV) ou le ^{60}Co . Les cellules incubées avec l'homologue non bromé, la thymidine, et sans drogue ont été utilisées comme contrôles.

Radiosensibilisation des cellules MC7-L1 par le CuPBr₈(PyPrBr₂)₄

Un test de formation de colonies avec le radiosensibilisateur CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ a aussi été effectué sur les cellules MC7-L1. Ces cellules de carcinome mammaire de souris Balb/c ont été testées afin de pouvoir effectuer dans une étude subséquente la comparaison entre la radiosensibilité obtenue *in vitro* avec celle qui sera réalisée chez un modèle animal. Les MC7-L1 ont été obtenues par traitements répétés au médoxyprogesterone chez des souris Balb/c femelle (Lanari et al., 2001).

Sans addition de porphyrine bromée, les cellules MC7-L1 ont démontré une plus grande radorésistance que les cellules MDA-MB-231. Leur survie sans drogue à 2 Gy (rayons-x de 14,8 keV) a été de 70 % (figure 21), comparativement à 50 % pour les cellules MDA-MB-231. Comme observé chez les cellules MDA-MB-231, l'addition du contrôle CuP(PyPre)₄ à une concentration de 10 µM a augmenté, mais de façon non significative, la survie des cellules MC7-L1. Le CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ (10 µM) a quant à lui fait diminuer de 41,4 % la survie des cellules MC7-L1, en comparaison avec son homologue sans brome. L'effet radiosensibilisant mesuré était aussi fonction de la concentration du CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ (résultats non présentés). Bien que l'effet radiosensibilisant du CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ mesuré chez les cellules MC7-L1 soit moins important que chez les cellules MDA-MB-231, ces résultats supportent l'utilisation de cette lignée cellulaire de souris pour les études *in vivo* de ces radiosensibilisateurs.

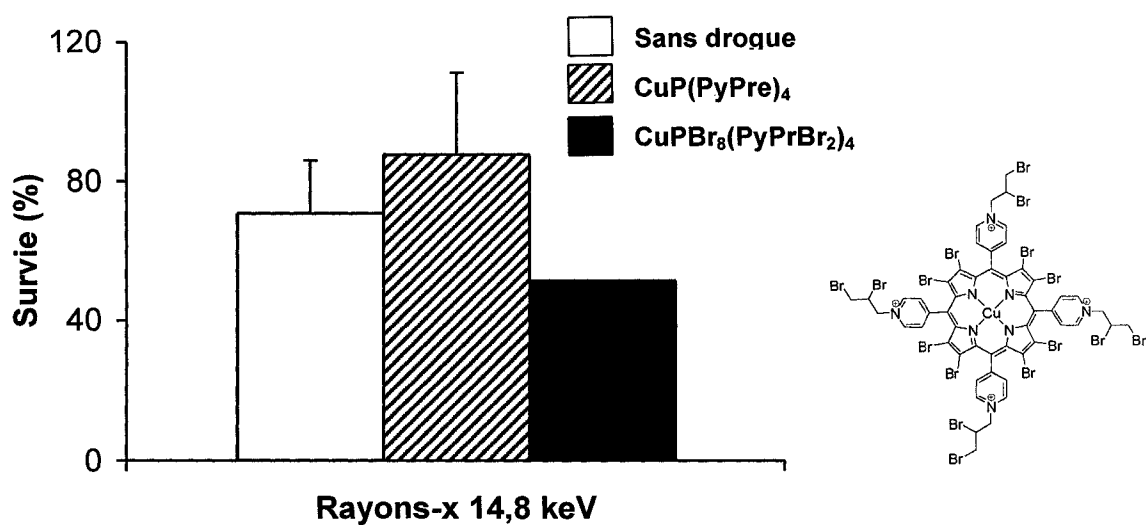


Figure 21. Effet du radiosensibilisateur $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, portant 16 bromes, sur la survie des cellules cancéreuses mammaires de souris MC7-L1. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec 10 μM de drogue et irradiées par la suite à 2 Gy avec les rayons-x (14,8 keV). Les cellules incubées avec l'homologue non bromé, le CuP(PyPre)_4 , et sans drogue ont été utilisées comme contrôles.

Accumulation cellulaire des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines cationiques

L'accumulation cellulaire de ces composés bromés dérivés de porphyrine a été mesurée pour vérifier si l'addition des bromes sur les porphyrines cationiques pouvait affecter leur incorporation chez les cellules cancéreuses du sein. La présence des bromes sur le centre de la porphyrine a inhibé la fluorescence intrinsèque de la porphyrine. En conséquence, la quantité de drogue accumulée par les cellules MDA-MB-231 a été mesurée par spectrophotométrie en utilisant le λ_{max} correspondant pour chacun des composés (figure 22).

L'addition des bromes sur le centre de la porphyrine a déplacé le λ_{max} de 425 nm à 460 nm, ce qui concorde avec des données déjà publiées (BATINIC-HABERLE et al., 1997).

Parmi les drogues testées, l'accumulation cellulaire des porphyrines avec les bromes en périphérie a été augmentée, respectivement de 2,5 fois pour le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et de 4 fois pour le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, en comparant avec le contrôle sans brome (figure 22). D'un autre côté, l'accumulation cellulaire du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$, la porphyrine avec les bromes sur le noyau aromatique, n'a pas augmenté par rapport à son homologue non bromé. Les valeurs d'accumulation pour le contrôle non bromé $\text{CuP}(\text{PyM})_4$ (avec des groupements méthyles en périphérie) ainsi que le $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$ (avec des groupements propényles périphériques) n'ont pas été significativement différentes, supportant que l'augmentation de l'accumulation cellulaire des porphyrines testées étaient principalement reliée à la présence des bromes en périphérie.

Ces résultats d'incorporation ont aussi révélé une corrélation avec l'effet radiosensibilisateur mesuré par test de formation de colonies. Ainsi, les porphyrines bromées qui démontraient le meilleur potentiel radiosensibilisant étaient aussi celles qui s'accumulaient le plus dans la cellule. L'addition de brome a augmenté l'hydrophobicité des porphyrines ; par exemple le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ a été l'un des meilleurs radiosensibilisateurs, tout en étant celui qui s'accumulait le mieux dans les cellules et qui était le moins soluble dans l'eau.

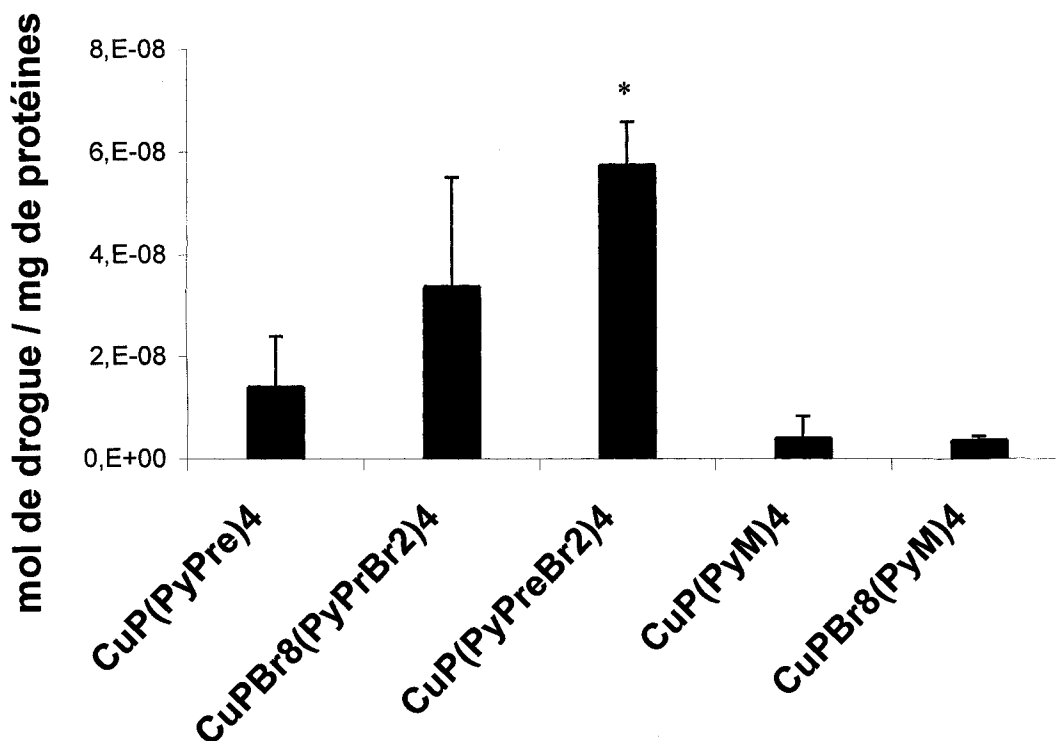


Figure 22. Accumulation chez les cellules MDA-MB-231 des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines. Les cellules ont été lysées après 4 heures d'incubation avec 10 μ M de porphyrines et la quantité de drogue accumulée (en mol de drogue par mg de protéines dans le lysat cellulaire) a été calculée par essais spectrophotométriques. L'accumulation de CuP(PyPreBr₂)₄ a été significativement différente de son contrôle non bromé CuP(PyPre)₄ (*Test Student $p < 0,0006$). L'essai a été répété 3 fois et les résultats sont présentés comme la moyenne \pm l'écart-type.

Stabilité sous rayonnement des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines cationiques

La stabilité de la structure chimique des porphyrines cationiques bromées après l'exposition aux radiations a été mesurée. Le but était de vérifier si la radiosensibilisation pouvait être associée à la formation de produits de dégradation ou de radio-produits toxiques, notamment par dissociation des bromes induite par les électrons aqueux ou de basse énergie. Tous les dérivés de porphyrine mentionnés dans cette étude ont été analysés. Uniquement les résultats obtenus avec les dérivés de porphyrine bromés sur les groupements périphériques et avec le contrôle non bromé correspondant sont présentés. Le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ possédait les meilleures propriétés optiques permettant de suivre sa stabilité structurale par analyse spectrophotométrie et HPLC (figure 23).

L'irradiation des radiosensibilisateurs $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et de leur homologue non bromé CuP(PyPre)_4 n'a pas modifié leurs spectres d'absorption après 2 ou 100 Gy de ^{60}Co (figure 23A, B et C). En plus, aucune modification de structure chimique apparente du $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ par la radiation n'a été détecté à l'aide du HPLC (figure 23D). Aucun des pics secondaires de porphyrine, qui correspondraient à la dissociation des bromes, est apparu post-irradiation. L'analyse des chromatogrammes HPLC de la porphyrine non bromée correspondante ont donné les mêmes résultats, c'est-à-dire aucune détection de produit de dégradation après irradiation au ^{60}Co (figure 23E).

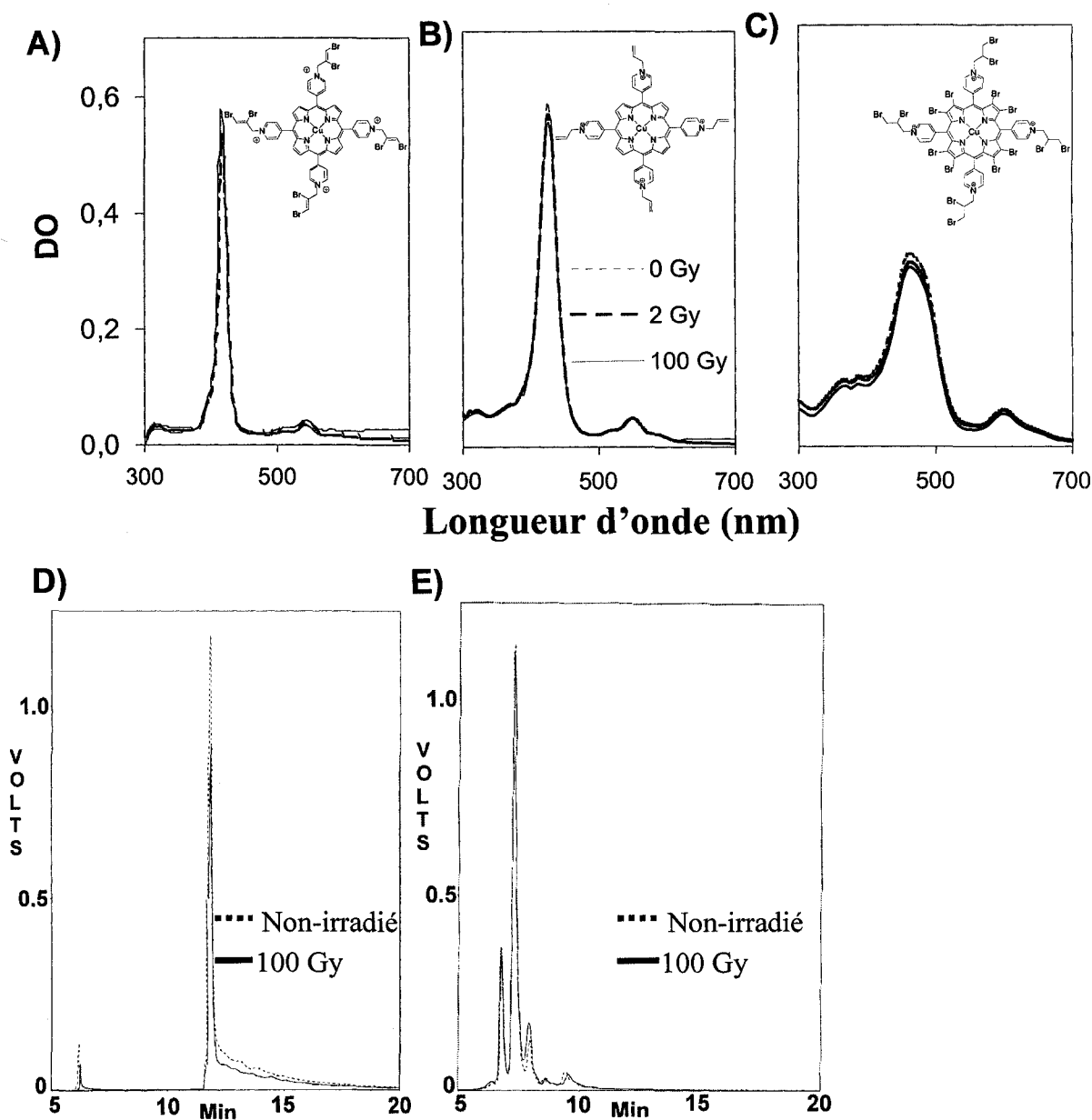


Figure 23. Effet de la radiation sur la structure chimique des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines. Spectres d'absorption de (A) $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$, (B) $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et (C) CuP(PyPre)_4 après irradiation à 2 Gy (ligne avec tirets), 100 Gy (ligne pleine) ou non irradié (ligne pointillée). Profile d'élution par HPLC de (D) $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et (E) CuP(PyPre)_4 après irradiation à 100 Gy (ligne pleine) et le contrôle non irradié (ligne pointillée). Les chromatogrammes sont représentatifs de trois expériences indépendantes irradiées avec le ^{60}Co . Le chromatogramme HPLC du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ n'est pas disponible, dû à l'interférence causée par le nombre élevé de bromes présents sur la molécule et la sensibilité de l'appareil utilisé.

La différence des temps de rétention, 11,7 minutes pour le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ comparé à 7,3 minutes pour le CuP(PyPre)_4 , a permis aussi de confirmer que l'addition de brome a eu pour conséquence d'augmenter l'hydrophobicité de cette porphyrine.

Des études visant à mesurer la dissociation du brome sur les porphyrines $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ ont été menées par l'équipe du Dr Léon Sanche en irradiant ces porphyrines avec des électrons de basses énergies dans une chambre hypervide. Aucune dissociation de brome n'a été mesurée (résultats non présentés). La rupture de la liaison du brome ne semblerait donc pas être un mécanisme impliqué dans l'effet radiosensibilisant.

La stabilité après irradiation des porphyrines bromées a aussi été appuyée par un test de formation de colonies avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ à 15 μM (figure 24). Cette concentration a été utilisée, même si elle présentait une toxicité cellulaire de base assez importante, afin que la solution irradiée sans cellule contienne suffisamment de porphyrine pour augmenter les probabilités que les molécules de porphyrine soient irradiées. Le milieu ainsi que les drogues seules, sans cellules, ont été irradiés avec 2 Gy de ^{60}Co avant de les mettre en contact avec les cellules MDA-MB-231. Le milieu de base irradié sans drogue a mené à une légère diminution non-significative de la survie cellulaire, diminution qui est restée inchangée avec l'ajout des porphyrines irradiées. Cette diminution pourrait s'expliquer par l'appauvrissement du milieu suite à l'irradiation, engendré par une radiodégradation des nutriments et la formation d'espèces réactives dans le milieu. Les valeurs de survie cellulaires ont été corrigées pour la toxicité cellulaire des composés sans radiation. Ces résultats indiquent donc que l'irradiation des porphyrines bromées ne

conduit par à la formation de produits toxiques, puisque aucune toxicité cellulaire supplémentaire n'a été détectée avec l'irradiation du radiosensibilisateur bromé avant le traitement des cellules.

Les deux autres porphyrines testées, CuP(PyM)_4 et $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$, ont démontré la même stabilité sous rayonnement par spectrophotométrie, HLPC et test de formation de colonies (résultats non présentés).

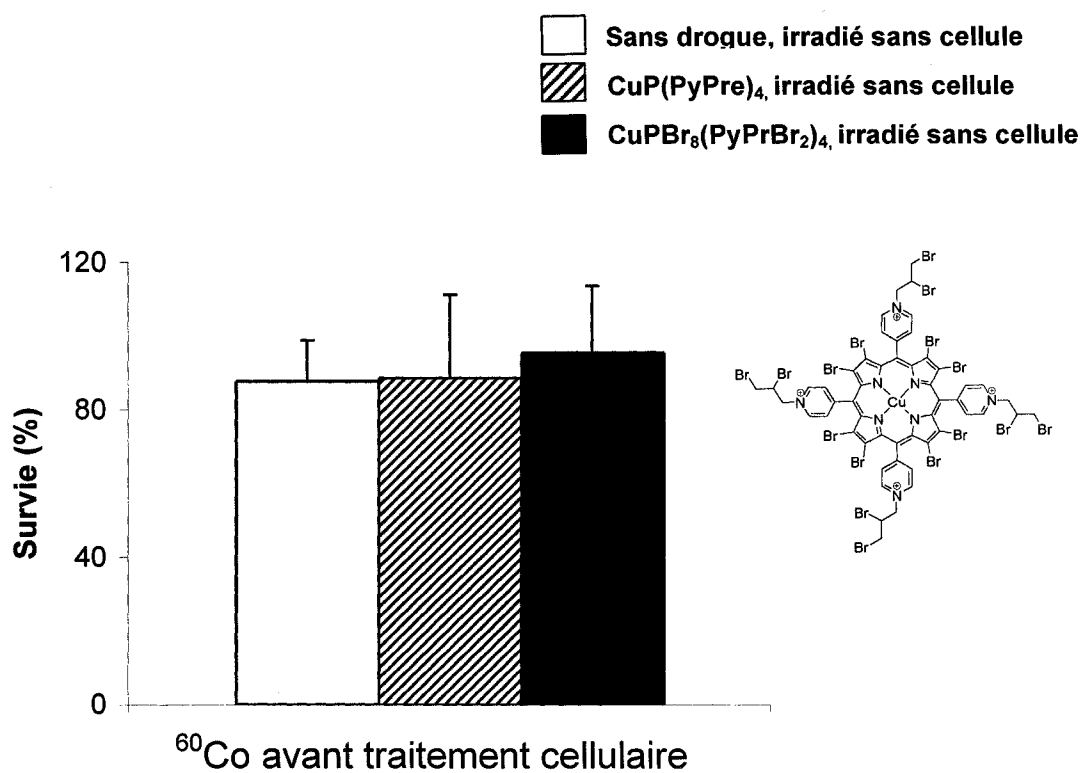


Figure 24. Effet du CuPBr₈(PyPrBr₂)₄ pré-irradié seul sur la survie des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Le radiosensibilisateur (15 μ M) a été irradié sans cellules à 2 Gy avec le ⁶⁰Co et incubé par la suite en présence des cellules pendant 4 heures. L'homologue non bromé, le CuP(PyPre)₄, et le milieu sans drogue irradiés seuls avant l'incubation avec les cellules ont été utilisés comme contrôles.

L'effet des radiosensibilisateurs bromés n'est pas associé à l'induction de l'apoptose

Divers essais ont été réalisés pour investiguer plus en profondeur le mécanisme de mort cellulaire impliqué dans le processus de radiosensibilisation. La capacité des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines à s'incorporer dans la membrane de la mitochondrie et à perturber le potentiel membranaire mitochondrial après l'irradiation ont été étudiées à l'aide du Mitotracker®Red.

La perméabilisation de la membrane de la mitochondrie conduit généralement à une chute du potentiel mitochondrial caractéristique de l'apoptose (COSTANTINI et al., 2000). Le Mitotracker®Red CMXROS est un colorant fluorescent lipophile et cationique sélectif qui s'accumule dans les mitochondries actives grâce à leur potentiel membranaire négatif (une plus faible accumulation du colorant donnera une plus faible intensité de fluorescence qui correspond à potentiel membranaire décroissant). Il se concentre à l'intérieur de la mitochondrie et demeure à ce niveau par fixation de ses groupements chlorométhyles aux groupements sulfhydryles libres de la mitochondrie. Il présente aussi une bonne photostabilité, sans présenter d'évidence de cytotoxicité (PENDERGRASS et al., 2004).

Aucune variation significative de l'incorporation du colorant dans les cellules MDA-MB-231 avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ irradiées à 2 Gy de ^{60}Co n'a été mesurée à partir de 0,25 heure jusqu'à 72 heures post-irradiation (figure 25). L'incorporation est toujours demeurée maximale, que les cellules soient traitées avec la drogue ou avec le contrôle non bromé. Ces résultats soutiennent que la mort cellulaire engendrée par le traitement com-

biné de $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et de radiation contourne la perturbation de la membrane mitochondriale et suggèrent que cette porphyrine n'a pas d'effet toxique sur la membrane de la mitochondrie. Des résultats similaires ont été obtenus avec les autres porphyrines (résultats non présentés).

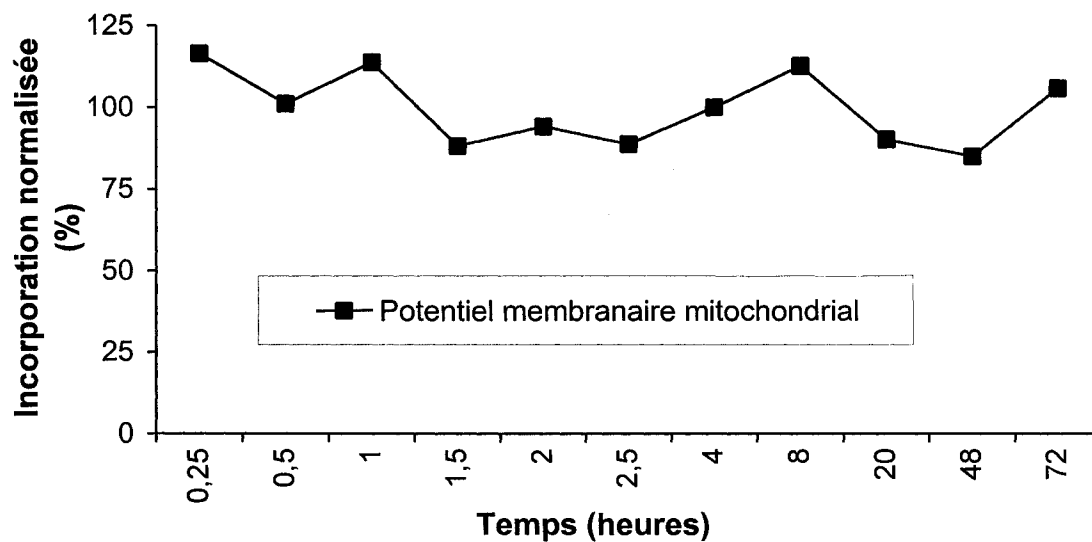


Figure 25. Variation du potentiel membranaire mitochondrial des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées 4 heures avec 10 μM de $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et soumises à 2 Gy de ^{60}Co . La détection de la variation du potentiel membranaire mitochondrial a été effectuée de 0,5 à 72 heures post-irradiation et les résultats sont présentés en incorporation cellulaire normalisée (%) du colorant Mitotracker®Red CMXRos en fonction des contrôles non irradiés et non bromés comme décrit dans Matériel et méthodes. Résultats représentatifs d'une série d'essais.

La discrimination entre les cellules vivantes, apoptotiques et les non viables a été exécutée pour vérifier si l'effet radiotoxique des porphyrines bromées en périphérie sur les cellules résultait en une induction de cette mort cellulaire. L'externalisation des phosphatidylsérines a d'abord été mesurée en utilisant des essais de fixation d'annexine. Des analyses de FACScan ont été effectuées avec les trois porphyrines bromées incubées avec les cellules MDA-MB-231 et analysées à partir de 0,5 heure (2 Gy de ^{60}Co) puisse que l'externalisation des phosphatidylsérines est un événement précoce durant l'apoptose. Les cellules peuvent prendre de 1 à 96 heures post-irradiation pour entrer en apoptose et ce temps est variable selon le stimuli (COHEN-JONATHAN et al., 1999). De plus, la mort mitotique peut survenir par apoptose plusieurs divisions après l'irradiation. Les analyses ont donc été effectuées jusqu'à 72 heures post-irradiation. Toutes les analyses entre 0,5 et 72 heures ont donné les mêmes résultats, ceux à 72 heures sont illustrés à la figure 26.

Sans drogue et sans radiation, presque aucune cellule apoptotique n'a été détectée par fixation exclusive à l'annexine V (absence de population cellulaire dans le quadrant en bas à droite du scan correspondant) (figure 26). Seulement une très faible proportion de cellules ont fixé l'annexine V et l'iodure de propidium, représentant le niveau de base de cellules nécrosées (population cellulaire dans le quadrant en haut à droite du scan correspondant). Lorsque les cellules ont été irradiées, aucune variation significative de fluorescence n'a été observée.

La staurosporine a été utilisée comme contrôle positif pour induire l'apoptose. Cet essai était fonctionnel puisque la staurosporine a induit un déplacement de la population cellulaire vers le quadrant en bas à droite sans augmenter la réponse à l'iodure de propi-

dium. Ce déplacement, en plus de faire voir la capacité des cellules MDA-MB-231 à entrer en apoptose, a aussi permis de suggérer que la fixation d'annexine sans traitement était due à de la fixation non spécifique.

Ni les cellules avec le milieu sans drogue irradié à 2 Gy, ni aucune des trois porphyrines bromées incubées seules ou combinées avec une dose de 2 Gy n'a réussi à induire une apoptose détectable par cet essai. La réponse négative à l'annexine chez les cellules MDA-MB-231 traitées avec les drogues bromées et la radiation est restée invariable peu importe le temps d'incubation post-irradiation étudié à l'intérieur de 72 heures (valeurs non présentées).

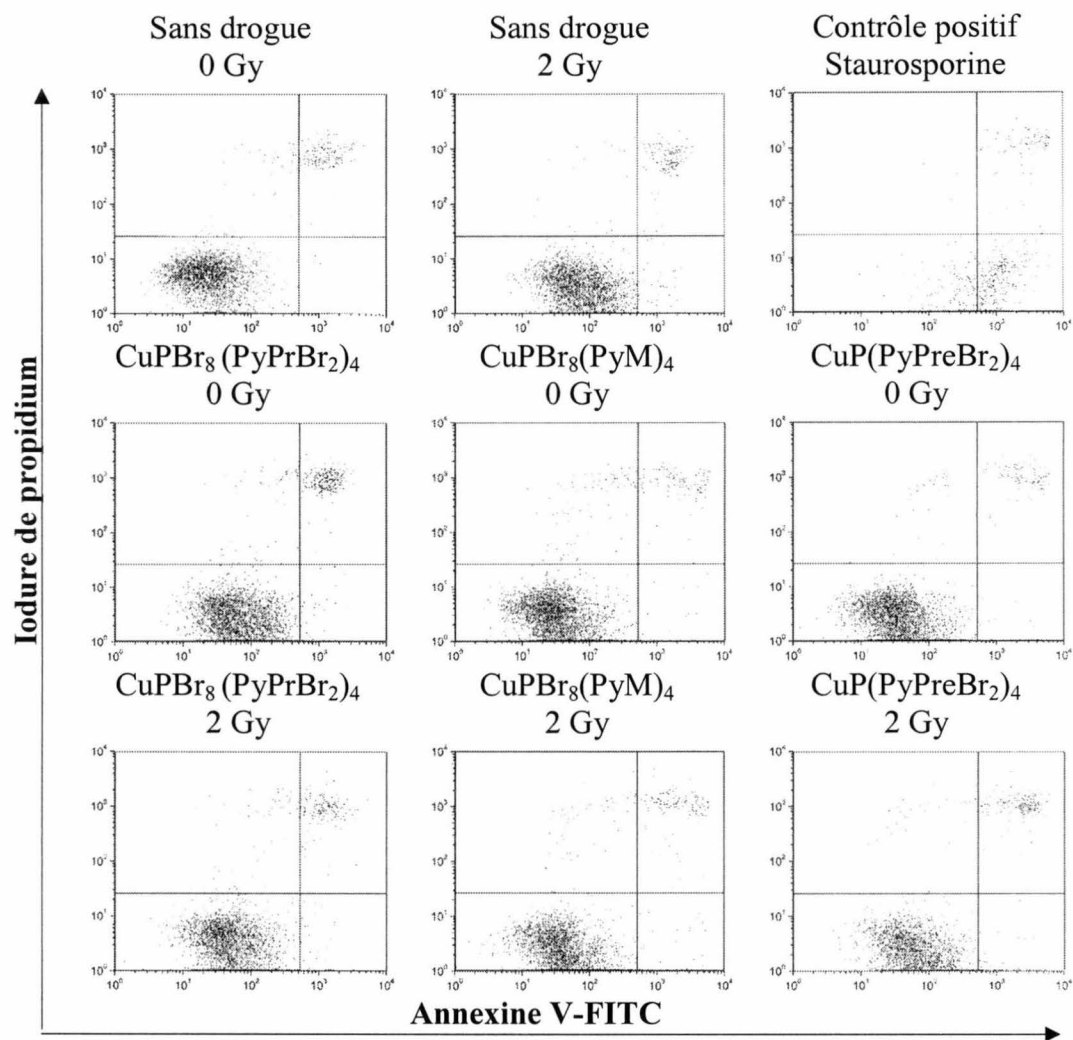


Figure 26. Exposition des phosphatidylsérines chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été incubées pendant 4 heures avec les porphyrines bromées puis irradiées à 2 Gy de ^{60}Co . La fixation du colorant a été mesurée après 72 heures post-irradiation par cytométrie à flux. La fluorescence verte de l'annexine V-FITC (axe x) a été détectée dans le canal FL1 et la fluorescence rouge de l'iodure de propidium (axe y) dans le canal FL2.

Par la suite, ces résultats ont été confirmés avec l'essai YO-PRO®-1. Le marqueur fluorescent vert YO-PRO®-1 iodide est un cyanure monomérique présentant une fluorescence beaucoup plus intense lorsqu'il est intercalé dans l'ADN. La fluorescence du colorant non lié est donc en conséquence négligeable. Les membranes cellulaires deviennent légèrement perméables durant l'apoptose. Ce changement permet au colorant YOPRO 1, mais non à l'iodure de propidium, de pénétrer les cellules en apoptose. Cependant les deux colorants peuvent imprégner les membranes plus fuyantes des cellules nécrotiques ou mortes et aucun ne pénètre les cellules viables (IDZIOREK et al., 1995)(Molecular probes, www.probes.com). Il n'y a pas de perte de l'intégrité membranaire durant les stages précoces de l'apoptose, mais il y a une modification de la perméabilité membranaire qui permet sélectivement l'entrée de quelques molécules imperméantes qui fixent l'ADN (IDZIOREK et al., 1995).

Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, puis irradiées à 2 Gy de ^{60}Co (figure 27). Aucun changement dans l'induction de l'apoptose, relié à une coloration par le YO-PRO®-1 n'a été observé. De même, aucune nécrose associée à l'accumulation de l'iodure de propidium n'a pu être mesurée. L'incorporation de ces colorants par les cellules traitées avec le radiosensibilisateur est restée égale à celle des contrôles non traités, indépendamment du temps d'incubation. Ce phénomène a aussi été observé avec le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ (valeurs non présentées).

Finalement, les cellules traitées avec chacune des trois porphyrines bromées et irradiées avec du ^{60}Co à 2 Gy n'ont également pas démontré de changements morphologi-

ques caractéristiques associés à l'apoptose. Aucune fragmentation spécifique de l'ADN en échelles nucléosomales n'a été observée sur gel d'agarose (résultats non présentés).

Tous ces résultats supportent l'idée de la résistance à faible dose, comme celles des fractions d'irradiations cliniques, des cellules cancéreuses à l'apoptose induites par les radiations. La dose de 2 Gy utilisée n'a pas été une dose assez élevée pour induire seule un niveau d'apoptose ou de nécrose détectable. Elle a été jugée acceptable puisque qu'elle correspondait à une survie des cellules MDA-MB-231 de 50 %. La dose de radiation n'a pas été augmentée pour les essais de détection d'apoptose, étant donné que le but n'était pas d'induire ces morts cellulaires, mais plutôt de vérifier si la réduction de survie engendrée par nos radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines (voir figures 16 et 19) correspondait à de l'apoptose radio-induite.

En fait, la seule mort cellulaire qui aurait dû être décelable est celle qui correspondrait à la toxicité intrinsèque des drogues sans radiation sur les cellules MDA-MB-231 (voir table 2). À l'exception du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, les toxicités sont très basses. Le type de mort radio-induite avec la dose de 2 Gy a pu être non détectable par les essais apoptotiques utilisés. Les porphyrines ont été incubées 4 heures en présence des cellules avant que le milieu ne soit changé. La toxicité amenée par le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a peut-être été rapide, le temps d'incubation et le changement de milieu ayant éliminé les cellules mortes qui auraient pu répondre aux essais. Toutefois, une légère nécrose causée par le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ sans radiation, qui est restée la même suite à l'irradiation, a été détectée avec le YO-PRO®-1 et l'iodure de propidium, mais elle a été non visible à la figure 27

comme les valeurs irradiées ont été normalisées avec celles sans radiation. Des tests de viabilité sur les cellules pendant l'incubation avec la porphyrine auraient pu être effectués.

En résumé, tous ces résultats soutiennent que l'apoptose et la nécrose ne sont pas le type de mort cellulaire principalement impliqué dans l'effet radiosensibilisateur des porphyrines bromées sur les cellules MDA-MB-231.

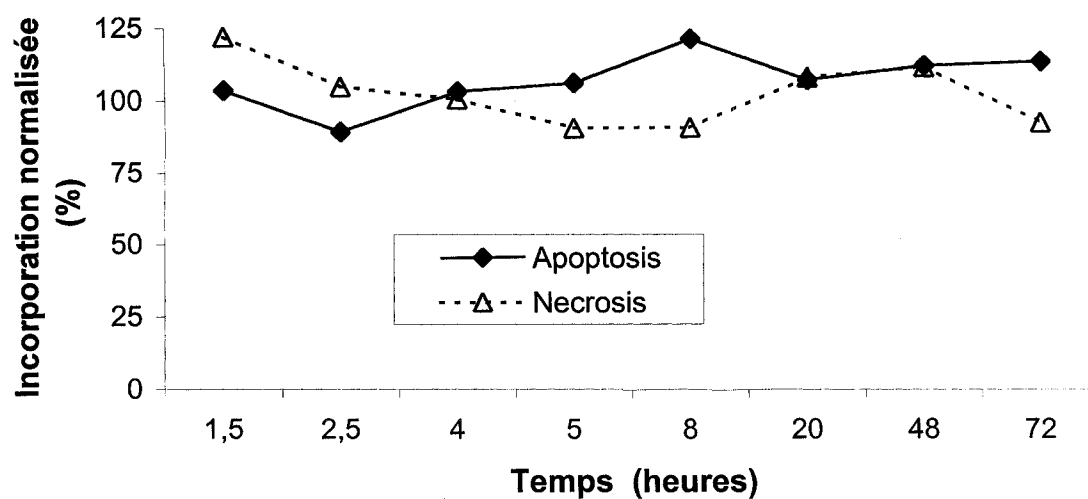


Figure 27. Variation d'induction d'apoptose ou de nécrose chez les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231. Les cellules ont été traitées pendant 4 heures avec 10 μM de $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et soumises à 2 Gy de ^{60}Co . La détection de la coloration des acides nucléiques par YO-PRO®-1 a été effectuée de 1,5 à 72 heures post-irradiation. Les résultats sont représentés en incorporation cellulaire normalisée (%) du colorant YO-PRO®-1 pour l'apoptose et de l'iodure de propidium pour la nécrose en fonction des contrôles non irradiés et non bromés comme décrit dans la section matériel et méthodes. Résultats représentatifs d'une série d'essais.

DISCUSSION

Cette étude visait à évaluer et à comparer des dérivés de métalloporphyrines tétracationiques bromées afin de démontrer leur potentiel d'utilisation comme nouveaux radiosensibilisateurs pour le traitement des cellules cancéreuses mammaires.

L'utilisation de porphyrines cationiques comme nouvelle classe de molécules porteuses d'atomes radiosensibilisants, tels le brome, l'iode ou le platine, pourrait augmenter la mort cellulaire radio-induite. L'addition de bromes sur la porphyrine devrait conférer à la molécule un bon potentiel radiosensibilisateur. Les caractéristiques électroniques et chimiques du brome, soit sa masse atomique (Z) élevée et sa nature électrophile, sont adéquates pour augmenter la toxicité locale en combinaison avec la radiation, par résonance ou par des mécanismes non résonants selon l'énergie de la radiation (PIGNOL et al., 2003)(KOBAYASHI et al., 2002)(KARNAS et al., 1999)(LARSON et al., 1989).

Cette étude a principalement démontré la capacité radiosensibilisante des dérivés de métalloporphyrines tétracationiques bromés nouvellement synthétisés. Les tests de formation de colonies avec trois porphyrines bromées et leurs homologues non bromés exécutés sur les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231 ont prouvé l'effet radiosensibilisateur de l'ajout de bromes périphériques sur la molécule porteuse. Aucun des contrôles sans bromes n'a induit de variation de survie cellulaire. Alors que la porphyrine portant 16 bromes, $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, a démontré un effet radiosensibilisateur proportionnel à la dose de radiation entre 1 et 3,5 Gy, maximisé par une énergie de radia-

tion s'approchant de l'énergie de la couche k du brome et fonction la concentration du radiosensibilisateur entre 2,5 et 10 μM . L'effet combiné de 10 μM de $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)$ et de 2 Gy de radiation a engendré une réduction de la survie cellulaire de 76,6 % aux rayons-x 14,8 keV, 53,8 % aux rayons-x 70,1 keV et de 48,4 % au ^{60}Co , suggérant la prédominance du mécanisme résonant.

L'augmentation de l'efficacité du ^{60}Co à 2 Gy est demeurée similaire que les cellules soit traitées avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ ou le $\text{H}_2\text{PBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, donc que la porphyrine soit complexée avec un cuivre central ou non. La présence du cuivre n'étant alors pas impliquée dans la radiosensibilisation, ce qui ne semblerait pas être le cas de certains autres métaux au potentiel de réduction plus important (DO NASCIMENTO et al., 2005)(O'HARA et al., 1989). Seule la porphyrine cuivrée a été conservée puisque le $\text{H}_2\text{PBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ était plus toxique, moins stable et plus complexe à obtenir que son homologue cuivré.

Le deuxième dérivé de porphyrine bromé a avoir présenté un effet radiosensibilisateur et à confirmer que la radiosensibilisation a été due aux bromes en périphérie a été le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, portant huit bromes sur ses groupements propényles latéraux. Son efficacité à 2 Gy de ^{60}Co a été la même que celle du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, soit environ 45 %. Tandis que le troisième composé synthétisé et testé, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ portant huit bromes sur le centre de la porphyrine, n'a eu aucun impact. Une explication possible a été que l'introduction de plus de quatre halogènes sur le cycle peut résulter en une augmentation des propriétés antioxydantes et en une diminution prononcée de la basicité de la porphy-

rine (associé avec l'électroaffinité des halogènes). La substitution de constituants électrophiles sur le noyau de la porphyrine peut drastiquement changer le potentiel redox d'une métalloporphyrine. La transition de CuP(PyM)_4 vers $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ pourrait conférer un léger potentiel antioxydant à une porphyrine n'en ayant pas auparavant. En effet, d'autres équipes ont démontré que le $\text{MnPBr}_8(\text{PyM})_4$ surpassait l'activité superoxide dismutase de la MnP(PyM)_4 sans brome (DO NASCIMENTO et al., 2005)(BATINIC-HABERLE et al., 1997).

L'identification des bromes impliqués dans la radiosensibilisation était d'un grand intérêt pour améliorer l'efficacité de ces radiosensibilisateurs, mais aussi pour de futures études de structure/activité. Les données de survie obtenues avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ ont clairement indiqué une absence de contribution par les bromes sur le centre de la porphyrine. De façon intéressante, la synthèse du dérivé de porphyrine octabromé en périphérie $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ a été plus facile à réaliser. Cette drogue a aussi été moins toxique et plus stable en absence de radiation que la porphyrine avec 16 bromes $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ (dégradation et péremption moins rapides du composé et toxicité cellulaire constante). Elle présentait à la fois un effet radiosensibilisateur similaire. Elle a donc été la drogue la plus attrayante de cette étude.

Les bromes qui se sont avérés être les atomes radiosensibilisants ont été ceux situés en périphérie de la porphyrine. Nos résultats suggèrent que la présence de bromes en périphérie entraîne une augmentation de l'accumulation cellulaire, car les porphyrines radiosensibilisatrices portant leurs bromes sur les chaînes latérales ont été les seules drogues à avoir présenté un haut taux d'incorporation cellulaire. Le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a été

incorporé 2,5 fois plus et le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ 4 fois plus que leur homologue non bromé (figure 22). Nos résultats ne permettent cependant pas de déterminer si la présence des bromes augmente l'incorporation cellulaire ou si elle diminue la vitesse de sortie de la drogue.

L'hydrophobicité des radiosensibilisateurs a aussi été reliée à leur accumulation, donc à leur efficacité. Les chromatogrammes HPLC ont démontré que le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ a été plus hydrophobe que son homologue sans brome. En fait, les deux radiosensibilisateurs avec les bromes externes ont été les deux porphyrines avec les temps de rétention les plus longs et les drogues les plus retenues ont aussi été les moins solubles dans l'eau (résultats non présentés). Ces observations sont supportées par de précédentes études ayant démontré que l'agrégation intermoléculaire favorise la rétention cellulaire et augmente l'efficacité du traitement (SCHAFFER et al., 2003)(VICENTE, 2001).

L'équipe de Ricchelli a effectué une étude exhaustive sur l'efficacité de porphyrines tétracationiques en TPD en fonction de leur hydrophobicité et de grandes similitudes avec nos résultats peuvent être observées (RICCHELLI et al., 2005). Les auteurs ont changé le degré de lipophilicité en remplaçant un des groupements méthyles par une chaîne alkyle de longueur variable, soit de 1, 6, 14 ou 22 carbones. Leur produit de départ C1 était un homologue non cuivré du CuP(PyM)_4 testé dans notre étude. Cette équipe a démontré que l'augmentation de la longueur de la chaîne périphérique de carbone entraînait une augmentation de la propriété lipophylique, ce qui se traduisait par une plus grande accumulation cellulaire et une efficacité cytotoxique accrue en TPD. Leurs dérivés C1 et C6 n'ont démontré aucune toxicité sans lumière, alors que ce fut le cas des déri-

vés C14 et C22. C22 étant d'ailleurs trop hydrophobe, l'agrégation de la porphyrine a commencé à interférer avec son efficacité. Une analogie avec nos dérivés bromés de porphyrines peut être effectuée, car l'hydrophobicité était augmentée par la présence de bromes, surtout externes. D'ailleurs, les proportions entre leurs quantités de porphyrines accumulées et les nôtres ont été très similaires. Les radiosensibilisateurs les plus efficaces ont été les porphyrines bromées les plus accumulées au niveau cellulaire, les plus hydrophobes et les plus toxiques.

La présence de groupements latéraux hydrophobes sur la porphyrine peut faciliter la localisation cellulaire de la drogue, puisque ces groupements interviennent dans l'accumulation cellulaire, plutôt qu'avec l'activité biologique (ALI & VAN LIER, 1999). La présence de groupements méthyles sur le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ et non de groupements propyles, comme sur le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, pourrait être un facteur diminuant l'accumulation du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$. Toutefois, le contrôle non bromé $\text{CuP}(\text{PyPre})_4$ possédant des chaînes latérales de trois carbones n'a pas été accumulé d'une façon significativement supérieure.

Cette analyse suggère encore que les bromes latéraux soient responsables de l'accumulation cellulaire supérieure et non la faible différence d'hydrophobicité entre les groupements méthyles et propyles. Une confirmation supplémentaire pourrait être obtenue en remplaçant les méthyles du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ par des propyles ou même des groupements encore plus lipophiles. Peut importe l'augmentation dans l'accumulation cellulaire du $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ qui pourrait être amenée, le comportement similaire du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ a démontré que les bromes doivent être en périphérie pour être radiosensibilisants.

Nos porphyrines cationiques bromées radiosensibilisantes se sont accumulées dans les cellules, mais leur cible cellulaire principale n'a pas encore été identifiée. Les porphyrines sont reconnues pour se localiser dans plusieurs compartiments cellulaires, selon leurs caractéristiques chimiques (WOODBURN et al., 1991). Les membranes cellulaires et les mitochondries sont des sites potentiels pour ces radiosensibilisateurs, comme beaucoup de sensibilisateurs de structures similaires (OLEINICK & EVANS, 1998). Les tests effectués avec les marqueurs apoptotiques fluorescents n'ont pas seulement été utiles pour déterminer le mode de mort cellulaire, mais ont amené un éclaircissement sur la localisation cellulaire de nos radiosensibilisateurs. L'absence de variation du potentiel membranaire mitochondrial, de la perméabilité membranaire et de l'exposition des phosphatidylsérines semblent avoir discriminé la membrane plasmique et de la mitochondrie comme cible du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et du $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$. Les compartiments cellulaires où s'accumulent les radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines restent à être déterminés avec exactitude, mais les cibles cellulaires potentiellement sensibles sont nombreuses (FERRI & KROEMER, 2001). Par exemple, une étude effectuée avec le $\text{H}_2\text{P}(\text{PyM})_4$ et une série de ses dérivés avec une chaîne latérale de longueur variable en carbone plus hydrophobes a identifié les lysosomes comme cible de ces composés (RICCHELLI et al., 2005).

Un des mécanismes de radiosensibilisation par nos porphyrines bromées proposait l'arrachement du brome par un électron secondaire et la formation d'un site radicalaire instable sur la molécule porteuse. Les résultats d'analyses par spectres UV et HPLC des radiosensibilisateurs bromés dérivés de porphyrines cationiques sous rayonnement suggèrent une stabilité de structure chimique. Aucun produit de dégradation et aucune dissocia-

tion du brome suite à l'irradiation n'ont été détectés, ni aucune toxicité cellulaire supplémentaire des radiosensibilisateurs pré-irradiés.

L'indisponibilité de contrôles internes sur HPLC, correspondant à la molécule parent portant une quantité variable de bromes, ne permettait pas d'exclure l'hypothèse que le départ d'un seul brome n'aurait pas affecté le chromatogramme et suffirait pour induire l'effet radiosensibilisant. Toutefois, grâce aux expériences effectuées par l'équipe du Dr Léon Sanche, nous avons pu confirmer la stabilité du brome sur la molécule porteuse observée par HPLC. À l'aide du même appareillage ayant permis la détection de la déshalogénéation du BrdU en chambre hyper-vide, le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$ ont été analysés. Les radiosensibilisateurs sont étalés en monocouche chemiabsorbée sur une surface d'or, puis bombardés avec des électrons de basse énergie. Les groupements chimiques formés suite à une capture d'électrons de basse énergie ont été détectés par spectroscopie de masse. En présence de dissociation du brome, un fragment neutre ou un halogène anionique peuvent être détectés (ABDOUL-CARIME et al., 2001)(ABDOUL-CARIME et al., 2000). Dans le cas des porphyrines bromées $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ et le $\text{CuPBr}_8(\text{PyM})_4$, aucun fragment n'a été décelé par cette méthode (résultats non présentés).

Le mécanisme par lequel nos radiosensibilisateurs bromés réagissent avec la radiation reste à être élucidé, l'accès à une source de radiation synchrotron n'ayant pas été réalisable. Toutefois, nos résultats suggèrent fortement la prévalence de la résonance sur le mécanisme non résonant. Les conditions d'irradiation optimale avec la source de rayons-x polyénergétiques disponible étaient à 14,8 keV. Ce protocole favorisant la quantité de

photons ayant l'énergie de la couche K du brome (13,47 keV) a permis d'obtenir la meilleure radiosensibilité, mais de façon non significative.

L'énergie de la radiation employée pour irradier les cellules cancéreuses est un des paramètres pouvant être adapté pour l'amélioration d'un traitement. L'irradiation avec une source synchrotron a permis de démontrer des radiosensibilisations par mécanisme résonant et non résonant (PIGNOL et al., 2003)(KOBAYASHI et al., 2002). Toutefois, lorsque l'énergie fixée permettait la résonance avec les couches électroniques internes de l'atome, l'efficacité a été beaucoup plus importante. Une équipe a rapporté un large excès de dommages à l'ADN non réparés par l'irradiation du *cis*-platine avec une source de radiation monochromatique près de la couche électronique K du platine, i.e. 78,4 keV. Une augmentation des bris doubles brins d'ADN de 27 fois a été mesurée comparativement aux bris doubles brins formés par l'irradiation sans *cis*-platine. Le nombre de bris mesuré a diminué lorsque l'énergie des photons s'est éloignée de celle de l'orbital K du platine, mais un niveau important de bris d'environ 5 fois supérieur est resté présent (BISTON et al., 2004).

Une autre équipe a observé une tendance similaire en irradiant un mélange de BrdU et de nucléosides solides, pour simuler un modèle d'ADN. L'irradiation au ^{60}Co a donné les mêmes produits de dégradation, suite de la débromation, mais avec un ratio beaucoup plus faible qu'aux rayons-x à 13,51 et 13,43 keV. De plus, la formation de déoxyurine a été de 2,5 fois plus importante à 13,51 qu'à 13,43 keV, soit au-dessus et au-dessous de 13,47 keV (l'énergie de la couche K du brome) (FURUSAWA et al., 1996).

Une troisième équipe s'est penchée sur le cas de l'iododéoxyuridine. Leurs calculs théoriques de simulations Monte-Carlo ont été confirmés par des mesures cellulaires de la formation de bris doubles dans l'ADN *in vitro*. Une formation de bris plus complexes et plus nombreux de 10 % a été observée avec une énergie légèrement plus élevée que 33,2 keV (orbital K de l'iode) comparativement à la source de ^{60}Co (KARNAS et al., 2001).

De ce fait, la résonance d'un photon avec un électron d'une orbitale interne de l'atome radiosensibilisant, suivie de l'éjection de ce dernier, représente le processus opérant majoritairement la radiosensibilisation par cette classe de composés. Malgré cela, les mécanismes non résonants restent très fonctionnels et non négligeables. Au point de vue clinique, la fonctionnalité des deux processus n'a pas la même importance. L'observation d'effet radiosensibilisateur avec le ^{60}Co fournit des avenues d'utilisation avantageuses pour traiter une variété de tumeurs avec ces nouveaux radiosensibilisateurs bromés. Les rayons-x sont des photons moins énergétiques et utilisés pour traiter les tumeurs en surface. Alors que les tumeurs plus en profondeur se traitent avec un rayonnement plus énergétique, comme les rayons gamma. Ainsi, le mécanisme non résonant prédominera lorsque les radiosensibilisateurs seront utilisés dans le traitement des cancers du sein ou du cerveau.

L'emphasis lors de traitements antitumoraux est souvent mise sur l'induction de l'apoptose. Dans cette étude, des essais pour mesurer l'apoptose radio-induite ont été utilisés. Ce type de mort avait initialement été visé pour bien mettre en évidence l'efficacité des radiosensibilisateurs chez les cellules radiorésistantes, puisque la résis-

tance aux radiations est fréquemment rapportée comme étant reliée avec la résistance à l'induction d'apoptose chez les cellules tumorales (HALL, 2000). Les processus de morts cellulaires sont toutefois complexes. Donc, bien qu'un effet radiosensibilisant important ait été observé avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, aucune induction d'apoptose n'a été détectée. Ces résultats sont très plausibles, puisque l'exposition aux radiations génère chez les cellules plusieurs catégories de morts et de larges gammes d'effets réversibles ou irréversibles, à échéance immédiate ou à long terme, comme la formation de lésions chromosomiques non réparables mais à effet immédiat non létal (FAVAUDON, 2000). La radiosensibilisation a donc stimulé d'autres morts radio-induites ou d'effets néfastes permanents, la mort mitotique ou la mort reproductive par exemple.

Toutefois, nos résultats mettent un bémol sur la nécessité d'un traitement à engendrer de la mortalité cellulaire par apoptose, tout comme ceux de Ruth (RUTH & RONINSON, 2000). L'action de Pgp (P-glycoprotein Multidrug Resistance Gene 1) sur des cellules HeLa modifiée a inhibé spécifiquement l'apoptose, mais n'a eu aucun effet significatif sur la résistance à la radiation. L'inhibition de l'apoptose a été associée à une augmentation de la mort mitotique et de la sénescence dans les cellules endommagées par la radiation. L'un ou l'autre des processus de mort va donc contrebalancer l'absence de l'un de ceux-ci et le niveau de mortalité cellulaire totale restera identique après un traitement. Ces observations suggèrent que l'induction de la mort reproductive et de la mort mitotique suffise en absence d'apoptose.

La lignée cellulaire MDA-MB-231 est considérée comme sensible aux drogues anti-cancéreuses. Donc, elle n'exprime pas un niveau élevé de Pgp, associé au mécanisme de résistance multi-drogue, mais elle possède la capacité d'engendrer des clones résistants avec une surexpression de Pgp (NOSKOVA et al., 2002)(STINGL et al., 1992). L'exemple du paragraphe précédent est donc présenté pour illustrer la possibilité de mécanismes changeant la balance entre les types de morts radio-induites suite à l'irradiation de nos radiosensibilisateurs mais en diminuant la survie totale.

La mort mitotique peut survenir seule quand l'apoptose est inhibée, sans que les tests de formation de colonies ne varient. La mort mitotique peut être confondue avec l'apoptose en stade précoce, surtout parce que la mort mitotique souvent se termine en apoptose, mais l'apoptose n'est pas nécessaire pour l'effet létal de la mort mitotique. Donc, la mort mitotique et la sénescence apparaissent être très acceptables dans le traitement du cancer. La sénescence est cependant moins souhaitable, car elle peut avoir des effets secondaires néfastes dans certaines conditions (RONINSON et al., 2001). De nouvelles thérapies combinant plusieurs catégories de morts pourront être envisagées et s'avérer très efficaces.

Une grande ambivalence reste observable dans le comportement radiosensibilisateur et radioprotecteur des porphyrines synthétiques et des métalloporphyrines. La majorité des porphyrines sont inactives pour augmenter l'effet létal des radiations ionisantes ou ne l'augmentent que très faiblement. Ces molécules peuvent avoir une activité catalytique pro ou antioxydante, dépendamment de l'affinité électronique et du potentiel de réduction relié au métal central (VICENTE, 2001). Ainsi, certains dérivés de porphyrines couplées

au manganèse agissent comme superoxide dismutase en catalysant la conversion du radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Cette conversion protège les cellules contre les dommages causés par le $\bullet\text{OH}$ et s'accompagne de la transition de l'état oxydatif du métal de Mn(III) à Mn(II) porté par la porphyrine MnP(PyM)_4 . Cette dernière porphyrine est l'homologue manganeux du CuP(PyM)_4 présenté dans la présente étude. *In vitro* et *in vivo*, ce composé MnP(PyM)_4 s'est montré un bon capteur de radicaux et a conféré un effet protecteur contre la radiation (LEE & PARK, 2004). Par le système xanthine / xanthine oxydase, les métalloporphyrines cationiques MnP(PyM)_4 et FeP(PyM)_4 ont présenté une bonne activité SOD, alors que l'activité SOD du CuP(PyM)_4 et de la porphyrine non couplée ont été nulles. La porphyrine portant le fer a toutefois démontré une cytotoxicité assez sévère, révélant le caractère pro oxydant de l'atome de fer et suggérant que le H_2O_2 formé a été reconverti en $\bullet\text{OH}$ par la réaction de Fenton (OHSE et al., 2001). La même analyse a également été effectuée sur des mitochondries *in vitro* et les auteurs en sont arrivés aux mêmes conclusions (NEPOMUCENO et al., 2002).

Certaines métalloporphyrines peuvent parfois présenter un effet antagoniste dépendamment des conditions. Une porphyrine couplée au manganèse s'est avérée pro et antioxydante (PEREZ & CEDERBAUM, 2002). Un dérivé de porphyrine cuivré a aussi démontré un effet radiosensibilisant et radioprotecteur selon sa concentration (SCHAFFER et al., 2003).

Le comportement potentiellement radiosensibilisateur de plusieurs métalloporphyrines avec l'irradiation gamma a été étudié en conditions aérobiques et hypoxiques. Deux

séries de porphyrines ont été synthétisées à cette fin; une version cationique et anionique de dérivés sans métal, complexés au Co, au Zn, au Mn, au Fe, au Cu et au Pd. La porphyrine couplée au cobalt a été la plus efficace dans toutes les conditions et elle a été la seule à présenter une radiosensibilisation en présence d'oxygène avec un ratio radiosensibilisateur de 1,2. La radiosensibilisation a été meilleure en absence d'oxygène, plus d'une porphyrine a été active avec des RRS entre 1,1 et 2,46. Le Co a été une espèce plus facilement réduite que les autres (O'HARA et al., 1989). Les auteurs ont utilisé une dose de radiation de 16 Gy et une concentration de drogue de 100 μ M, des conditions expérimentales drastiques comparativement à celles de notre étude. Nos radiosensibilisateurs bromés ont fourni des ratios radiosensibilisateurs entre 1,52 et 2,22 en présence d'oxygène (Table 1). Nos métalloporphyrines bromées présentent donc un gain avantageux en radiosensibilisation sur celles précédemment étudiées.

Les mécanismes pro et antioxydants produits par le potentiel de réduction des métaux centraux sur les porphyrines ont influencé la décision de comparer l'effet radiosensibilisateur du $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ avec celui du $\text{H}_2\text{PBR}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ pour vérifier l'influence du cuivre. Ces deux composés bromés ont démontré le même niveau de radiosensibilisation en présence ou en absence de cuivre complexé, la présence du Cu n'entraînant aucun effet biologique. L'ajout du Cu sur ces porphyrines bromées a toutefois facilité leur synthèse et leur a conféré une meilleure stabilité. Dans notre cas, la radiosensibilisation par nos porphyrines bromées a probablement augmenté le mécanisme non résonant du ^{60}Co . Nous pourrions donc présumer que changer l'atome de cuivre central de nos radiosensibilisateurs pour un métal possédant un meilleur potentiel de réduction combinerait ces deux

modalités de radiosensibilisation. Ces processus redox pourraient cependant expliquer certaines valeurs non-significatives, les légères variations de survies cellulaires de nos contrôles non bromées CuP(PyPre)_4 et $\text{H}_2\text{P(PyPre)}_4$ entre eux ou par rapport aux contrôles sans drogue.

Peu de porphyrines, à l'exception de la Photofrin et du Texaphyrin gadolinium (III), ont démontré leur efficacité comme radiosensibilisateur jusqu'en clinique, tout en s'accumulant de façon spécifique dans les tumeurs. La Photofrin a présenté un effet radiosensibilisant sur plusieurs types cellulaires et a augmenté le temps de dédoublement de tumeurs de souris *in vivo* (SCHAFFER et al., 2003)(SCHAFFER et al., 2002). Cependant, elle est constituée d'un mélange hétérogène, son mécanisme d'action est peu commenté et elle peut engendrer des effets secondaires néfastes (VICENTE, 2001).

Le Motexafin gadolinium ou Texaphyrin gadolinium, un macrocycle synthétique semblable aux porphyrines, fixe l'atome de gadolinium d'une façon plus stable qu'il ne le serait au centre d'une porphyrine. La nature paramagnétique du gadolinium permet son usage en imagerie par résonance magnétique (IRM). La radiosensibilisation considérable *in vitro* et *in vivo* et la bonne affinité électronique de cette molécule ont été rapportées. Elle réagit avec les électrons aqueux et permet la production subséquente de radicaux hydroxyles (VICENTE, 2001). Plusieurs études cliniques se sont penchées sur le Texaphyrin gadolinium. Cette drogue semble très populaire dans le traitement des métastases du cerveau, comme démontré par des études cliniques phase III (MILLER et al., 1999). Une étude en phase I a également été publiée sur la radiosensibilisation par le Motexafin gado-

linium des cancers pancréatiques et biliaires et une très légère toxicité au niveau de la peau a été observée (RAMANATHAN et al., 2005).

La radiosensibilisation par le Texaphyrin gadolinium a été évaluée sur trois modèles différents de tumeurs et un de ceux-ci a été utilisé pour comparer plusieurs métallo-texaphyrines. Les auteurs ont étudié des modèles tumoraux, ayant affirmé que les tests de formation de colonies *in vitro* comme ceux que nous avons effectués sous-estiment l'efficacité du Texaphyrin gadolinium (MILLER et al., 1999). Une irradiation de 2,5 Gy en présence de Texaphyrin gadolinium a fait régresser la tumeur de la même manière que 5 Gy d'irradiation seule, donc d'un rapport 2. Ces résultats ont été comparables à ceux que nous avons obtenus avec les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 irradiées à 1 Gy en présence de $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ (figure 16). La survie cellulaire à 1 Gy en présence de radiosensibilisateur a été identique à celle des cellules irradiées sans drogue à 2 Gy. Une étude *in vitro* sur des cellules cancéreuses mammaires de souris EMT-6 a démontré une augmentation de l'efficacité de la radiation par le Motexafin gadolinium seulement en hypoxie et en présence d'acide ascorbique (DONNELLY et al., 2005). Le facteur de modification de la dose a été de 1,36, une valeur assez équivalente aux RRS de nos radiosensibilisateurs bromés en périphérie et sans privation d'oxygène.

L'utilisation de dérivés de porphyrine comme radiosensibilisateurs comporte plusieurs avantages sur celle d'analogues de pyrimidine, comme le BrdU. L'efficacité du traitement au BrdU dépend de la prolifération des cellules, plus une cellule est en division plus elle synthétise de l'ADN et plus elle incorporera le BrdU. L'effet radiosensibilisant du BrdU est d'autant plus grand que la quantité de drogue accumulée est importante et

l'accumulation est proportionnelle au temps d'exposition des cellules à la drogue (LAWRENCE et al., 1990). La radiosensibilisation par les dérivés de porphyrine dépend également de leur incorporation cellulaire. Toutefois, ces composés peuvent pénétrer par transport passif ou endocytose et se distribuent par partition dans les compartiments cellulaires. Ces drogues ne sont en aucun cas dépendantes de la prolifération des cellules (RICCHELLI et al., 2005). Ces radiosensibilisateurs peuvent donc offrir la même efficacité chez les tumeurs à prolifération lente ou rapide. Cette propriété de nos radiosensibilisateurs représente un avantage marqué comparativement à plusieurs agents de chimiothérapie dont l'effet cytotoxique est étroitement lié à l'activité proliférative de la tumeur.

Le BrdU s'incorpore dans l'ADN en remplacement de la thymidine. Ce composé augmente les dommages induits par la radiation ionisante en causant des bris simples et doubles dans l'ADN (LING & WARD, 1990). De plus, il inhiberait la réparation des dommages pouvant être létaux (FRANKEN et al., 2000). Le risque qu'il cause des mutations est donc élevé. Plusieurs modèles et mécanismes de mutagenèse du BrdU sont étudiés (HANUS et al., 2005). Les cellules peuvent perdre leur capacité à reconnaître et à réparer certains dommages. L'augmentation éventuelle de cancer secondaire et le développement de cellules plus résistantes ou plus agressives peuvent s'ensuivre, par l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs par exemple (BERRY & KINSELLA, 2001).

Un autre avantage de l'utilisation de porphyrines comme agents radiosensibilisants est l'amoindrissement de l'induction de mutations, comparativement aux analogues de pyrimidine, puisque les porphyrines ciblent principalement les membranes cellulaires et

non l'ADN (OLEINICK & EVANS, 1998). L'absence ou la présence d'induction de mutation par les porphyrines a particulièrement été étudiée sur les porphyrines utilisées comme photosensibilisateurs en TPD. Les dommages induits en TPD passent par l'oxygène singulet, une espèce réactive qui peut réagir avec plusieurs substrats comme les bases d'acides nucléiques de l'ADN (ALI & VAN LIER, 1999). Cette espèce ne parcourt qu'une courte distance (VICENTE, 2001). Donc, l'analyse des effets mutagènes des porphyrines en TPD peut être comparable à celle des porphyrines bromées radiosensibilisatrices.

L'effet mutagène d'une variété de photosensibilisateurs, la Photofrin, l'hématoporphyrine, des phtalocyanines et quelques dérivés de porphyrine a été mesuré sur des lignées de lymphoblastomes murins et humains. Une grande variabilité a été observée dans l'induction de mutations. Les résultats ont varié selon la lignée cellulaire et la drogue testée, certaines ont présenté un effet mutagène alors que d'autres n'ont eu aucun effet. La raison de cette variation est restée légèrement nébuleuse. Quoiqu'il en soit, les niveaux de mutagenèse observés sont restés bas, toutes les porphyrines étudiées ont été moins mutagènes que les rayons-x utilisés seuls (OLEINICK & EVANS, 1998).

La littérature ne rapporte pas de cas d'utilisation du BrdU pour radiosensibiliser les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-231, mais un large éventail de types cellulaires ont démontré une bonne sensibilité à cet agent. Prenons l'exemple de deux lignées cellulaires tumorales humaines, qui ont démontré une radiosensibilisation par le BrdU de 1,4 fois et de 2 fois (FRANKEN et al., 2000) et d'une lignée cellulaire de ron-

geurs (V79) chez qui la drogue a augmenté la sensibilité entre 3 et 12 % (LARSON et al., 1989).

Dans notre étude, le BrdU a été testé par formation de colonies sur les cellules MDA-MB-231 afin de comparaison avec les nouveaux radiosensibilisateurs bromés développés. Les effets radiosensibilisateurs du BrdU de 74,2 % avec le ^{60}Co et de 88,5 % avec les rayons-x (14,8 keV) (figure 20), ont été légèrement supérieurs à ceux obtenus avec le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$, respectivement de 48,4 % avec le ^{60}Co et de 76,6 % avec les rayons-x (14,8 keV) (figure 16 et 17). Cette variation dans la sensibilité des cellules MDA-MB-231 à ces deux drogues s'expliquerait par une variété de facteurs. Les cellules ont été incubées pendant une période de 24 heures en présence du BrdU, comparativement à 4 heures avec les porphyrines. De plus, la thymidine semble beaucoup favoriser la prolifération cellulaire. La radiosensibilisation se mesurant par rapport au contrôle non bromé correspondant, la radiosensibilisation du BrdU pourrait être surestimée. Nos radiosensibilisateurs pourraient donc être considérés comparables au BrdU.

Les diminutions de survie observées chez les deux lignées cellulaires avec le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ et $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ varient entre 40 et 80 %, selon l'énergie de la radiation utilisée. Il est important de bien concevoir quel est l'impact d'une telle diminution en clinique. Prenons par exemple une variation de survie de 20 % et considérons une tumeur pour laquelle la fraction de survie est de 0,8 suivant une irradiation de 2 Gy. Cette dose est couramment utilisée dans le traitement du cancer du sein. Assumant que chaque fraction du traitement de dose-multiple a toujours la même efficacité et qu'il n'y a pas de pro-

lifération cellulaire entre les irradiations, la survie suivant 30 irradiations de 2 Gy sera de $0,8^{30}$, ie $\approx 10^{-3}$. Donc, pour une tumeur qui aurait 10^8 cellules, le traitement laissera 10^5 cellules survivantes. Par contre, une fraction de survie de 0,6 suivant une irradiation de 2 Gy, soit la réduction 20 % comme mentionnée ci-haut, deviendra $0,6^{30}$ après 30 fractions, ie $\approx 2 \times 10^{-3}$ ou une moyenne de 37 cellules survivantes pour la même tumeur qui contenait 10^8 cellules au départ. La baisse de 20 % dans la survie peut donc conduire à une importante augmentation de l'efficacité de la radiothérapie (Tannock & Hill, 1992). En conséquence, les profits dans la réduction de la survie cellulaire amenés par le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ apparaissent considérables.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En résumé, nous avons démontré que de nouveaux radiosensibilisateurs dérivés de porphyrine, bromés sur les groupements en périphérie, avaient un grand potentiel dans le traitement des cellules cancéreuses mammaires. Ces composés, le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ et le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$, ont réduit de façon substantielle la survie des cellules cancéreuses du sein humaines MDA-MB-231 avec la radiation au ^{60}Co et ont été grandement accumulés au niveau cellulaire. Le $\text{CuPBr}_8(\text{PyPrBr}_2)_4$ a été plus actif avec les rayons-x, suggérant la prédominance du mécanisme résonant. Ce composé a aussi radiosensibilisé les cellules cancéreuses mammaires de souris MC7-L1, supportant l'étude de cette classe de radiosensibilisateurs sur un modèle animal éventuel. Plus particulièrement, le $\text{CuP}(\text{PyPreBr}_2)_4$ s'est avéré une drogue efficace, non toxique, stable, chimiquement facile à synthétiser et qui pourrait être utilisée dans le traitement de multiples cancers.

Plusieurs aspects du projet peuvent encore être abordés, approfondis ou perfectionnés. Les conditions expérimentales pourraient être optimisées; une cinétique du temps d'incubation des drogues en fonction de leur rétention pourrait être effectuée et le temps d'incubation des cellules avec les porphyrines optimisant la radiosensibilisation pourrait être déterminé. Versus les 4 heures utilisées dans l'étude, une incubation de 24 heures avec un plus faible pourcentage de sérum dans le milieu pourrait également être effectuée pour comparer avec exactitude les résultats obtenus avec le BrdU. La capacité à induire des dommages à l'ADN pourrait se vérifier et l'absence d'effet mutagène se confirmer.

Les mécanismes par lesquels les dommages cellulaires sont induits restent à être approfondis. La source de rayons-x utilisée pour les expérimentations présentées dans cette étude ne se trouvait pas à être monochromatique. La quantité de photons ayant l'énergie la plus propice à induire un effet radiosensibilisateur optimal n'était donc pas maximisée. L'irradiation à l'aide d'une source synchrotron près de l'énergie de la couche K du brome, soit 13,47 keV +/- 200 eV, permettrait d'observer l'impact réel du mécanisme résonant dans la radiosensibilisation par nos porphyrines bromées en périphérie (LARSON et al., 1989).

Les traitements de radiothérapie pour le cancer du sein sont majoritairement faits à l'aide de sources de radiations conventionnelles, comme des électrons, des photons très énergétiques, de 6 MV par exemple (VASS & BAIRATI, 2005)(HORTON et al., 2005). Donc, même si l'impact réel du mécanisme non résonant n'a pas pu être observé, avec de telles sources se sont les mécanismes non résonants qui seront responsables du plus grand pourcentage de l'efficacité de nos radiosensibilisateurs lors d'une application clinique potentielle. Comme mentionné précédemment, l'irradiation de nos radiosensibilisateurs au cobalt a permis de voir que les mécanismes non résonants sont possibles et efficaces. Donc, l'analyse de la génération des dommages cellulaires par nos radiosensibilisateurs devrait également être approfondie avec des sources polyénergétiques.

Une étude de radiolyse de l'eau avec nos radiosensibilisateurs permettrait de percevoir une diminution ou une amplification de leur effet radiotoxique en présence ou absence de certains radicaux et ainsi mieux discerner la façon dont fonctionne le mécanisme non résonant. Nous pourrions calquer sur nos radiosensibilisateurs une expérience où la

radiolyse gamma a été utilisée comme méthode pour étudier *in vitro* les mécanismes d'oxydation des lipoprotéines et les propriétés réductrices d'antioxydants en regard à leur capacité à capter les radicaux. Quelques nanosecondes après l'irradiation, une solution homogène de radicaux bien connus est formée, dont la nature dépend des conditions et peut être modifiée. L'irradiation des porphyrines pourrait être analysée en présence ou en absence d'air (rendement plus élevé en e_{aq}^- sans O_2), dans un milieu saturé en N_2O (conversion des e_{aq}^- en $^{\circ}OH$) ou en présence de capteurs de $^{\circ}OH$ (effet des e_{aq}^- seul) (BONNEFONT-ROUSSELOT, 2004). L'étude radiolytique de l'acide folique pour mettre en évidence son effet cytotoxique avec les radiations pourrait aussi être reprise avec nos porphyrines bromées (DELIPETAR-GRUDL & GETOFF, 2004).

Le type de mort cellulaire induit par la combinaison du traitement avec les radiosensibilisateurs et la radiation reste à être déterminé. L'absence d'apoptose dans la radiosensibilisation suggère l'implication de la mort mitotique ou de la mort reproductive. Divers essais plus spécifiques à certains types de mort peuvent être effectués en parallèle avec nos radiosensibilisateurs pour déterminer quelle mort cellulaire est engendrée. Le test de formation de colonies est très utilisé des les essais de radiosensibilité, pour déterminer la survie cellulaire suite au traitement. Cet essai est basé sur la capacité des cellules à former des colonies à partir d'un seul clone et a longtemps été considéré comme la méthode optimale pour mesurer la survie après l'irradiation, puisse qu'il tient compte de tous les type de morts et que seules les cellules vivantes et en division y répondront positivement. Cet essai ne différencie cependant pas les cellules en mort mitotique des cellules en mort reproductive, contrairement au test biochimique MTT. Celui-ci requière des mito-

chondries actives et mesure la réduction du sel de tétrazolium en produit final coloré (le formazan) par action de la succinate déshydrogénase. La sulforhodamine B peut aussi être utilisée pour mesurer la synthèse de protéines. Cet essai n'est pas relié à une réaction métabolique, le colorant fixe les cellules viables ou récemment lysées, mais non les débris cellulaires (qui peuvent parfois conserver une activité enzymatique résiduelle) (BANASIAK et al., 1999).

Des études plus explicites et une meilleure compréhension des processus cellulaires impliqués dans la radiosensibilisation seront aussi possible avec le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$. Ce composé était le plus prometteur, car en plus d'être un bon radiosensibilisateur, il ne possède aucun brome au centre, donc conserve sa fluorescence intrinsèque. Des analyses en microscopie à fluorescence pourront alors être effectuées pour déterminer son mécanisme d'entrée et sa localisation cellulaire (RICCHELLI et al., 2005)(WOODBURN et al., 1991).

Le $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ a d'ailleurs été le radiosensibilisateur avec la synthèse la plus simple. Cette drogue pourrait être chimiquement modifiée, certains groupements sur une ou plusieurs chaînes latérales de la molécule pourront être ajoutés, afin d'effectuer des études de structure-activité. Les possibilités sont plus ou moins limitées, mais la solubilité pourra être augmentée par la présence de groupements alcool. L'augmentation de la longueur des chaînes de carbone pourra favoriser la rétention cellulaire, donc l'efficacité, mais sans toutefois dépasser la longueur limite où la porphyrine s'agrégera en trop grande quantité (RICCHELLI et al., 2005).

Comme mentionné précédemment, cette classe de radiosensibilisateur s'est avérée efficace sur les cellules de souris MC7-L1. Ce type cellulaire génère des tumeurs sous-cutanées chez la souris qui peuvent être agressives mais sans réaction immunitaire dommageable (Lanari et al., 2001). L'effet radiosensibilisateur de nos drogues pourra donc être étudié chez ce modèle animal.

Le radiosensibilisateur $\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ est une métalloporphyrine dont l'atome central de cuivre pourrait aussi être remplacé par un isotope radioactif, le ^{64}Cu . Cet isotope produit des positrons pouvant être détectés par imagerie de type tomographie par émission de positrons. Une étude de biodistribution de $^{64}\text{CuP(PyPreBr}_2)_4$ est présentement en cours. D'autre part, le cuivre pourrait être substitué par du gadolinium. Cette approche permettrait de combiner radiosensibilisation et imagerie par IRM avec la même molécule. De cette façon, la localisation et l'efficacité de la drogue pourraient être visualisées et le suivi du traitement serait simplifié. Cette approche est d'ailleurs en cours d'essai clinique avec le Motexafin gadolinium, une molécule synthétique semblable aux porphyrines (DONNELLY et al., 2005)(MILLER et al., 1999). Un composé $\text{GdP(PyPreBr}_2)_4$ aurait pour avantage d'induire une radiosensibilisation à la fois par le gadolinium et les bromes périphériques, tout en permettant de suivre sa biodistribution par IRM.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche ; les Drs Johann E. van Lier, Darel J. Hunting et Benoit Paquette, pour m'avoir permis de travailler sur ce projet, parfois difficile, mais combien formateur. Je veux remercier particulièrement le Dr Paquette pour avoir favorisé au maximum ma formation de jeune chercheur.

Merci également aux membres du jury ; M. Éric Turcotte et Mme Claudine Rancourt, pour l'apport scientifique et le temps accordé, au FRSQ pour son support financier, au service de Radio-oncologie CHUS pour l'utilisation du Therapax et à M. Gordon M. Miskelly, University of Southern California, USA, pour ses précieux conseils de synthèse.

Merci à Jean-Philippe Tremblay-Morin pour s'être amusé à synthétiser les porphyrines, aux gens qui ont fait un passage dans le laboratoire chez Benoit ou Darel, plus spécialement à Martine Bisson, Hélène Therriault, Catherine Baptiste, Geneviève Drouin, Sonia Girouard et Nathalie Picard pour les échanges scientifiques mais surtout pour m'avoir endurée et Daniel Robillard pour le support informatique.

Finalement, mais non les moindres, merci à ma famille et à mon copain Yannick pour avoir toujours cru en moi et m'avoir poussée à me dépasser.

RÉFÉRENCES

- Abdoul-Carime, H., Dugal, P.C. & Sanche, L. (2000). Damage induced by 1-30 eV electrons on thymine- and bromouracil-substituted oligonucleotides. *Radiat Res*, **153**, 23-8.
- Abdoul-Carime, H., Huels, M.A., Illenberger, E. & Sanche, L. (2001). Sensitizing DNA to secondary electron damage: resonant formation of oxidative radicals from 5-halouracils. *J Am Chem Soc*, **123**, 5354-5.
- Abend, M. (2003). Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *Int J Radiat Biol*, **79**, 927-41.
- Abram Recht, D.F.H., Timothy J. Eberlein, Norman L. Sadowsky. (1996). Local-regional recurrence after mastectomy or breast conserving therapy. In *Diseases of the breast*, Jay R. Harris, M.E.L., Monica Morrow, Samuel Hellman (ed) pp. 649-667. Lippincott-Raven: Philadelphia.
- Ali, H. & van Lier, J.E. (1999). Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem Rev*, **99**, 2379-450.
- Banasiak, D., Barnetson, A.R., Odell, R.A., Mameghan, H. & Russell, P.J. (1999). Comparison between the clonogenic, MTT, and SRB assays for determining radiosensitivity in a panel of human bladder cancer cell lines and a ureteral cell line. *Radiat Oncol Investig*, **7**, 77-85.
- Batinic-Haberle, I., Liochev, S.I., Spasojevic, I. & Fridovich, I. (1997). A potent superoxide dismutase mimic: manganese beta-octabromo-meso- tetrakis-(N-methylpyridinium-4-yl) porphyrin. *Arch Biochem Biophys*, **343**, 225-33.
- Berry, S.E. & Kinsella, T.J. (2001). Targeting DNA mismatch repair for radiosensitization. *Semin Radiat Oncol*, **11**, 300-15.
- Biston, M.C., Joubert, A., Adam, J.F., Elleaume, H., Bohic, S., Charvet, A.M., Esteve, F., Foray, N. & Balosso, J. (2004). Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res*, **64**, 2317-23.
- Bonnefont-Rousselot, D. (2004). Gamma radiolysis as a tool to study lipoprotein oxidation mechanisms. *Biochimie*, **86**, 903-11.
- Carre, V., Jayat, C., Granet, R., Krausz, P. & Guilloton, M. (1999). Chronology of the apoptotic events induced in the K562 cell line by photodynamic treatment with hematoporphyrin and monoglucosylporphyrin. *Photochem Photobiol*, **69**, 55-60.

- Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L. & Hunting, D.J. (2004). Single-strand-specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Radiat Res*, **162**, 604-15.
- Cherry, R.J., Sorenson, J.A. & Michael, E.P. (2003). *Physics in nuclear medicine*. Saunders: Philadelphia. 523 p.
- Cosset, J-M. (2005). Hypofractionnement en radiothérapie : le retour ? *Cancer/Radiotherapie*, **9**, 366-73.
- Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D. & Kroemer, G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, **92**, 1042-53.
- Cowell, I.G., Durkacz, B.W. and Tilby, M.j. (2005). Sensitization of breast carcinoma cells to ionizing radiation by small molecule inhibitors of DNA-dependent protein kinase and ataxia telangiectasia mutated. *Biochemical Pharmacol*, **71**, 13-20.
- Delipetar-Grudl, A. & Getoff, N. (2004). Radiation-induced sensitizing effect of folic acid (vitamine B₁₁) and its synergistic action to mitomycin C: *In vitro* experiments and radiolysis. *Oncol Res*, **14**, 559-66.
- do Nascimento, E., de, F.S.G., Caetano, F.A., Fernandes, M.A., da Silva, D.C., de Carvalho, M.E., Pernaut, J.M., Reboucas, J.S. & Idemori, Y.M. (2005). Partially and fully beta-brominated Mn-porphyrins in P450 biomimetic systems: effects of the degree of bromination on electrochemical and catalytic properties. *J Inorg Biochem*, **99**, 1193-204.
- Dolgachev, V., Nagy, B., Taffe, B., Hanada, K. & Separovic, D. (2003). Reactive oxygen species generation is independent of de novo sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. *Exp Cell Res*, **288**, 425-36.
- Donnelly, E.T., Liu, Y., Paul, T.K. & Rockwell, S. (2005). Effects of Motexafin gadolinium on DNA damage and X-ray-induced DNA damage repair, as assessed by the Comet assay. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **62**, 1176-186.
- Dumitrescu, R.G. & Cotarla, I. (2005). Understanding breast cancer risk -- where do we stand in 2005? *J Cell Mol Med*, **9**, 208-21.
- Favaudon, V. (2000). [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother*, **4**, 355-68.
- Ferri, K.F. & Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, **3**, E255-63.

- Franken, N.A., Van Bree, C., Kipp, J.B., Rodermond, H.M., Haveman, J. & Barendsen, G.W. (2000). BrdUrd-induced radiosensitization of two human tumour cell lines at iso- levels of incorporation. *Oncol Rep*, **7**, 937-40.
- Furusawa, Y., Maezawa, H., Takakura, K., Kobayashi, K. & Hieda, K. (1996). Radiolytic products of bromodeoxyuridine in solids by ⁶⁰Co gamma-rays and monoenergetic soft x-rays at the K-absorption edge of bromine. *Acta Oncologica*, **35**, 877-82.
- Gebski, V., Lagleva, M., Keech, A., Simes, J. and Langlands A.O. (2006). Survival effects of postmastectomy adjuvant radiation therapy using biological equivalent doses : a clinical perspective. *Journal of the national cancer institute*, **98**, 26-38.
- Groves, M.D., Maor, M.H., Meyers, C., Kyritsis, A.P., Jaeckle, K.A., Yung, W.K., Sawaya, R.E., Hess, K., Bruner, J.M., Peterson, P. & Levin, V.A. (1999). A phase II trial of high-dose bromodeoxyuridine with accelerated fractionation radiotherapy followed by procarbazine, lomustine, and vincristine for glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **45**, 127-35.
- Guo, M., Chen, C., Vidair, C., Marino, S., Dewey, W.C. & Ling, C.C. (1997). Characterization of radiation-induced apoptosis in rodent cell lines. *Radiat Res*, **147**, 295-303.
- Hall, E.J. (2000). *Radiobiology for the radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 588 p.
- Hanus, M., Kabelac, M., Nachtigallova, D. & Hobza, P. (2005). Mutagenic properties of 5-halogenuracils: correlated quantum chemical ab initio study. *Biochemistry*, **44**, 1701-7.
- Hilmey, D.G., Abe, M., Nelen, M.I., Stilts, C.E., Baker, G.A., Baker, S.N., Bright, F.V., Davies, S.R., Gollnick, S.O., Oseroff, A.R., Gibson, S.L., Hilf, R. & Detty, M.R. (2002). Water-soluble, core-modified porphyrins as novel, longer-wavelength-absorbing sensitizers for photodynamic therapy. II. Effects of core heteroatoms and meso-substituents on biological activity. *J Med Chem*, **45**, 449-61.
- Hiraoka, M., Mitsumori, M. & Kokubo, M. (1997). The Roles and Controversies of Radiation Therapy in Breast Conserving Therapy for Breast Cancer. *Breast Cancer*, **4**, 127-33.
- Horton, J.K., Halle, J.S., Chang, S.X. & Sartor, C.I. (2006). Comparison of three concomitant boost techniques for early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **64**, 168-75.
- Huilgol, N.G., Chatterjee, N. & Singh, B.B. (1998). A clinical study to assess chlorpromazine as hypoxic cell sensitizer in head & neck cancer treated with conventional radiation. *Indian J Cancer*, **35**, 97-100.

- Idziorek, T., Estaquier, J., De Bels, F. & Ameisen, J-C. (1995). YOPRO-1 permits cytofluometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *J Immunol Meth*, **185**, 249-58.
- Jonathan, E.C., Bernhard, E.J. & McKenna, W.G. (1999). How does radiation kill cells? *Curr Opinion Chem Biol*, **3**, 77-83.
- Karnas, S.J., Moiseenko, V.V., Yu, E., Truong, P. & Battista, J.J. (2001). Monte Carlo simulations and measurement of DNA damage from x-ray-triggered auger cascades in iododeoxyuridine (IUdR). *Radiat & Environ Biophysics*, **40**, 199-206.
- Karnas, S.J., Yu, E., McGarry, R.C. & Battista, J.J. (1999). Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources. *Phys Med Biol*, **44**, 2537-49.
- Kobayashi, K., Frohlich, H., Usami, N., Takakura, K. & Le Sech, C. (2002). Enhancement of x-ray-induced breaks in DNA bound to molecules containing platinum: a possible application to hadrontherapy. *Radiat Res*, **157**, 32-7.
- Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S L. (1997). Female genital system and breast. In *Basic Pathology*, Saunders, W.B. (ed) pp. 597-635. W.B Saunders: Philadelphia.
- Lanari, C., Luthy, I., Lamb, C.A., Fabris, V., Pagano, E., Helguero, L.A., Sanjuan, N., Merani, S. & Molinolo, A.A. (2001). Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: *in vivo* and *in vitro* effects of estrogens and progestins. *Cancer Res*, **61**, 293-302.
- Larson, D., Bodell, W.J., Ling, C., Phillips, T.L., Schell, M., Shrieve, D. & Troxel, T. (1989). Auger electron contribution to bromodeoxyuridine cellular radiosensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **16**, 171-6.
- Lawrence, T.S., Davis, M.A., Maybaum, J., Stetson, P.L. & Ensminger, W.D. (1990). The dependence of halogenated pyrimidine incorporation and radiosensitization on the duration of drug exposure. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **18**, 1393-398.
- Le Sech, C., Takakura, K., Saint-Marc, C., Frohlich, H., Charlier, M., Usami, N. & Kobayashi, K. (2001). Enhanced strand break induction of DNA by resonant metal-innershell photoabsorption. *Can J Physiol Pharmacol*, **79**, 196-200.
- Lee, J.H. & Park, J.W. (2004). A manganese porphyrin complex is a novel radiation protector. *Free Radic Biol Med*, **37**, 272-83.
- Leira, F., Alvarez, C., Vieites, J.M., Vieytes, M.R. & Botana, L.M. (2002). Characterization of distinct apoptotic changes induced by okadaic acid and yessotoxin in the BE(2)-M17 neuroblastoma cell line. *Toxicol In Vitro*, **16**, 23-31.

- Leira, F., Vieites, J.M., Vieytes, M.R. & Botana, L.M. (2001). Apoptotic events induced by the phosphatase inhibitor okadaic acid in normal human lung fibroblasts. *Toxicol In Vitro*, **15**, 199-208.
- Lim, C.K., Rideout, J.M. & Peters, T.J. (1984). High-performance liquid chromatography of dicarboxylic porphyrins and metalloporphyrins: retention behaviour and biomedical applications. *J Chromatogr*, **317**, 333-41.
- Ling, L.L. & Ward, J.F. (1990). Radiosensitization of Chinese hamster V79 cells by bromodeoxyuridine substitution of thymidine: Enhancement of radiation-induced toxicity and DNA strand break production by monofilar and bifilar substitution. *Radiat Res*, **121**, 76-83.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K. (2000). Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics : a review. *Journal of controlled release*, **65**, 271-84.
- Marks, M.G., Shi, J., Fry, M.O., Xia, Z., Trzyna, M., Pokala, V., Ihnat, M.A. & Li, P-K. (2002). Effects of putative hydroxylated thalidomide metabolites on blood vessel density in the chorioallantoic membrane (CAM) assay on tumor and endothelial cell proliferation. *Biol Pharm Bull*, **25**, 597-604.
- Miller, R.A., Woodburn, K., Fan, Q., Renschler, M.F., Sessler, J.L. & Koutcher, J.A. (1999). *In vivo* animal studies with gadolinium (III) texaphyrin as a radiation enhancer. *Int J Oncol Biol Phys*, **45**, 981-89.
- Nakamura, S., Woo, C., Silberman, H., Streeter, O.E., Lewinsky, B.S. & Silverstein, M.J. (2002). Breast-conserving therapy for ductal carcinoma in situ: a 20-year experience with excision plus radiation therapy. *Am J Surg*, **184**, 403-9.
- Nepomuceno, M.F., Tabak, M. & Vercesi, A.E. (2002). Opposite effects of Mn(III) et Fe(III) of meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrins on isolated rat liver mitochondria. *J Bioenergetics Biomembranes*, **34**, 41-7.
- Noguchi, Y., Wu, J., Duncan, R., Strohal, J., Ulbrich, K., Akaike, T. and Maeda, H. (1998). Early phase tumor accumulation of macromolecules: a great difference in clearance rate between tumor and normal tissues. *Jpn J Cancer Res*, **89**, 307-14.
- Noskova, V., Dzubak, P., Kuzmina, G., Ludkova, A., Stehlik, D., Trojanec, R., Janostakova, A., Korinkova, G., Mihal, V. and Hajdich, M. (2002). In vitro chemoresistance profile and expression/function of MDR associated proteins in resistant cell lines derived from CCRF-CEM, K562, A549 and MDA-MB-231 parental cells. *Neoplasma*, **49**, 418-25.
- O'Hara, J.A., Douple, E.B., Abrams, M.J., Picker, D.J., Giandomenico, C.M. & Vollano, J.F. (1989). Potentiation of radiation-induced cell kill by synthetic metalloporphyrins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **16**, 1049-52.

- Ohse, T., Nagaoka, S., Arakawa, Y., Kawakami, H. & Nakamura, K. (2001). Cell death by reactive oxygen species generated from water-soluble cationic metalloporphyrins as superoxide dismutase mimics. *J Inorg Biochem*, **85**, 201-8.
- Oleinick, N.L. & Evans, H.H. (1998). The photobiology of photodynamic Therapy : Cellular Targets and Mechanisms. *Radiat Res*, **150 (Suppl)**, S146-S156.
- Pendergrass, W., Wolf, N. and Poot, M. (2004). Efficacy of MitoTracker Green™ and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry*, **61A**, 162-69.
- Perez, M.J. & Cederbaum, A.I. (2002). Antioxidant and pro-oxidant effects of a manganese porphyrin complex against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic Biol Med*, **33**, 111-27.
- Pignol, J.P., Rakovitch, E., Beachey, D. & Le Sech, C. (2003). Clinical significance of atomic inner shell ionization (ISI) and Auger cascade for radiosensitization using IUDR, BUdR, platinum salts, or gadolinium porphyrin compounds. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, **55**, 1082-91.
- Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M. & Held, K.D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *Lancet Oncol*, **6**, 520-8.
- Ramanathan R.K., Kakih, M., Mani, S., Deutsch, M., Perez, R.P., Ritter, M.A., Eiseman, J.L., Ivy, S.P., Trump, D.L., Belani, C.P., Parise, R.A., Potter, D.M. & Egorin, M.J. (2005). Phase I and pharmacokinetic study of the novel redox-active agent, motexafin gadolinium, with concurrent radiation therapy in patients with locally advanced pancreatic and biliary cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Ricchelli, F., Franchi, L., Miotto, G., Borsetto, L., Gobbo, S., Nikolov, P., Bommer, J.C. & Reddi, E. (2005). Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 306-19.
- Richards, R.A., Hammons, K., Joe, M. & Miskelly, G.M. (1996). Observation of a stable water-soluble lithium porphyrin. *Inorg. Chem.*, **35**, 1940-1944.
- Roninson, I.B., Broude, E.V. & Chang, B.D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat*, **4**, 303-13.
- Ross, G.M. (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocr Relat Cancer*, **6**, 41-4.
- Ruth, A.C. & Roninson. (2000). Effects of the mutigrug transporter P-Glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 2576-578.

- Santra, S., Kumaresan, D., Agarwal, N. & Ravikanth, M. (2003). cis- Pyridyl core-modified porphyrins for the synthesis of cationic water-soluble porphyrins and unsymmetrical non-covalent porphyrin arrays. *Tetrahedron*, **59**, 2353-2362.
- Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Hofstetter, A., Duhmke, E. & Jori, G. (2003). Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms. *Curr Pharm Des*, **9**, 2024-35.
- Schaffer, M., Schaffer, P.M., Corti, L., Gardiman, M., Sotti, G., Hofstetter, A., Jori, G. & Duhmke, E. (2002). Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental *in vivo* model. *J Photochem Photobiol B*, **66**, 157-64.
- Schmidt-Ullrich, R.K., Dent, P., Grant, S., Mikkelsen, R.B. & Valerie, K. (2000). Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res*, **153**, 245-57.
- Schmidt-Ullrich, R.K., Valerie, K., Chan, W., Wazer, D.E. & Lin, P.S. (1992). Expression of oestrogen receptor and transforming growth factor-alpha in MCF-7 cells after exposure to fractionated irradiation. *Int J Radiat Biol*, **61**, 405-15.
- Shi, Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol*, **8**, 394-401.
- Shibamoto, Y., Kubota, T., Kishii, K. & Tsujitani, M. (2000). Radiosensitivity of human pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*, and the effect of a new hypoxic cell sensitizer, doranidazole. *Radiother Oncol*, **56**, 265-70.
- Smith, B.D, Gross, C.P. Smith, G.L., Galusha, D.H. Bekelman, J.E. and Haffty, B. G. (2006). Effectiveness of radiation therapy for older women with early breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **98**, 681-690.
- Stingl, S., Andersen, R.J. and Emerman, J.T. (1992). In vitro screening of crude extracts and pure metabolites obtained from marine invertebrates for the treatment of breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, **30**, 401-6.
- Tafani, M., Minchenko, D.A., Serroni, A. & Farber, J.L. (2001). Induction of the mitochondrial permeability transition mediates the killing of HeLa cells by staurosporine. *Cancer Res*, **61**, 2459-66.
- Tannock, I.F. & Hill, R.P. (1992). *The basic science of oncology*. McGraw-Hill Inc: New York. 420 p.
- Vass, S. and Bairati, I. (2005). A cosmetic evaluation of breast cancer treatment : A randomized study of radiotherapy boost technique. *Int J Radiation Oncol Biol Phys*, **62**, 1274-82.

- Vicente, M.G. (2001). Porphyrin-based sensitizers in the detection and treatment of cancer: recent progress. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, **1**, 175-94.
- Whelan, T., MacKenzie, R., Julian, J., Levine, M., Shelley, W., Grimard, L., Lada, B., Lukka, H., Perera, F., Fyles, A., Laukkanen, E., Gulavita, S., Benk, V. & Szechtman, B. (2002). Randomized trial of breast irradiation schedules after lumpectomy for women with lymph node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, **94**, 1143-50.
- Withers, H.R. (1975). *The four R's of radiotherapy*, in Advances in Radiation biology, Lett. J.T. and Adler, H., Eds., Academic Press, New-York, 241 p.
- Wojcik, A., von Sonntag, C. & Obe, G. (2003). Application of the biotin-dUTP chromosome labelling technique to study the role of 5-bromo-2'-deoxyuridine in the formation of UV-induced sister chromatid exchanges in CHO cells. *J Photochem Photobiol B*, **69**, 139-44.
- Woodburn, K.W., Vardaxis, N.J., Hill, J.S., Kaye, A.H. & Phillips, D.R. (1991). Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem Photobiol*, **54**, 725-32.
- Wronski, R., Golob, N., Grygar, E. & Windisch, M. (2002). Two-color, fluorescence-based microplate assay for apoptosis detection. *Biotechniques*, **32**, 666-8.
- Xia, F. & Powell, S.N. (2002). The molecular basis of radiosensitivity and chemosensitivity in the treatment of breast cancer. *Semin Radiat Oncol*, **12**, 296-304.
- Xu, C., Meikrantz, W., Schlegel, R. & Sager, R. (1995). The human papilloma virus 16E6 gene sensitizes human mammary epithelial cells to apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 7829-33.
- Yang, L., Cao, Z., Yan, H. & Wood, W.C. (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res*, **63**, 6815-24.